

Université de Montréal

**Rôle du facteur de transcription PITX1 dans les pathogénèses de
l'ostéoporose et des maladies parodontales**

par
Nancy Karam

Département de Biochimie et médecine moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)
en biochimie et médecine moléculaire

Septembre 2015

© Nancy Karam, 2015

Résumé

L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une faible masse osseuse et une détérioration du tissu osseux. Cette condition entraîne une plus grande fragilité osseuse et des risques de fractures. Plusieurs études ont associé l'ostéoporose à la faible densité osseuse des mandibules, à la perte d'attache parodontale, à l'augmentation de la hauteur de la crête alvéolaire et à la chute des dents.

Cette étude vise à comprendre les mécanismes sous-jacents cette perte osseuse. En effet, au cours du développement des souris, PITX1 joue un rôle clé dans l'identité des membres postérieurs et dans le bon développement des mandibules et des dents. Son inactivation complète chez la souris mène à un phénotype squelettique sévère. Tandis que, son inactivation partielle provoque des symptômes apparentés à l'arthrose avec une augmentation de la masse osseuse au niveau de l'os cortical et de l'os trabéculaire. Inversement, une étude antérieure chez des jumelles monozygotiques discordantes pour l'ostéoporose, montrent une augmentation d'environ 8.6 fois du niveau d'expression du gène *Pitx1* chez la jumelle ostéoporotique.

Collectivement, ces données nous ont poussés à investiguer sur le rôle du facteur de transcription PITX1 dans le métabolisme osseux normal et pathologique. Dans ce contexte, des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* sur-exprimant *Pitx1* spécifiquement dans le tissu osseux sous le promoteur du collagène de type-I (fragment 2.1kpb) ont été générées et phénotypiquement caractérisées.

Ces résultats ont révélé que les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* présentaient un phénotype similaire à celui des patients ostéoporotiques accompagné d'une perte de dents et des problèmes dentaires et parodontaux.

De plus, cette étude a révélé que la surexpression de *Pitx1* induit une altération de l'homéostasie osseuse *via* l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine canonique. Cette hypothèse a été appuyée par le fait que le traitement des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* avec du chlorure de lithium, un activateur de la voie Wnt canonique, prévient le phénotype ostéoporotique chez ces souris.

Finalement, cette étude établit un rôle crucial de PITX1 dans la régulation de la masse osseuse et une implication possible dans l'ostéoporose et les maladies parodontales *via* l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine canonique.

Mots-clés : PITX1, Ostéoblastes, Masse osseuse, Ostéoporose, Problèmes dentaires, Maladies parodontales, Perte des dents, voie Wnt/ β -caténine, DKK1

Abstract

Osteoporosis is a progressive bone disease that is characterized by a decrease in bone mass and density leading to an increased risk of fracture. Several studies have linked osteoporosis to the low bone density of the mandibles, the periodontal attachment loss, increasing of the alveolar crest height and tooth loss.

This study aims to understand the mechanisms underlying bone loss. During mouse development, PITX1 plays a key role in the identity of the hindlimb and the proper development of the jaws and teeth. Interestingly, PITX1-null mice displayed severe skeletal phenotype. Whereas, ageing PITX1^{+/-} progressively developed OA-like lesions in cartilage associated with a drastic increase in cortical and trabecular bone formation. Conversely, expression analysis of osteoblasts derived from monozygotic twins discordant for osteoporosis reported an 8.6-fold up-regulation of *Pitx1* expression in osteoblasts from osteoporotic twins when compared with healthy ones.

Collectively, these data prompted us to investigate the role of PITX1 in normal and pathological bone metabolism. In this context, transgenic *Colla1-Pitx1* mice over-expressing *Pitx1* specifically in bone tissue under the type-I collagen promoter (2.3kb fragment) were generated and phenotypically characterized.

These data suggested that *Pitx1* overexpression induces an osteoporosis like phenotype accompanied with oral bone loss, edentulousness, dental and periodontal problems.

These results suggested that *Pitx1* overexpression induces alteration of bone homeostasis *via* the inactivating of the the Wnt/ β -catenin canonical pathway. This hypothesis was supported by the fact that treatment with lithium chloride, a Wnt canonical activator, rescued the phenotype.

Finally, this study establishes a crucial role of PITX1 in the regulation of bone mass and a possible involvement in the development of osteoporosis and periodontal disease *via* the inactivation of the Wnt/ β -catenin canonical pathway.

Keywords: PITX1, Osteoblasts, Bone mass, Osteoporosis, Dental problems, periodontal diseases, Tooth loss, Wnt/ β -catenin pathway, DKK1

Table des matières

I Introduction thèse.....	1
1.1 Objectif et hypothèse de travail	1
1.2 Organisation de la thèse	1
Chapitre 1 : Introduction	2
1.3 Définition de l'ostéoporose	3
1.4 Prévalence de l'ostéoporose.....	3
1.5 Variation de la masse osseuse au cours de la vie	4
1.6 Physiologie osseuse et pathophysiologie de l'ostéoporose.....	5
1.7 Types d'ostéoporose.....	5
1.7.1 L'ostéoporose primaire	5
1.7.2 L'ostéoporose secondaire.....	6
1.8 La mesure de la densité minérale osseuse (DMO).....	7
1.9 Facteurs de risque de l'ostéoporose.....	8
1.9.1 Le sexe, l'âge et l'éthnicité	9
1.9.2 Facteurs génétiques	9
1.9.3 Facteurs environnementaux	10
1.9.4 Facteurs hormonaux	10
1.9.5 Maladies associées à l'ostéoporose	11
1.10 Voie de signalisation Wingless (Wnt) dans l'ostéoporose	11
1.11 Gène de susceptibilité de l'ostéoporose.....	14
1.11.1 Low-density lipoprotein receptor (LPR5 et LPR6).....	15
1.11.2 Sclérostine (SOST)	16
1.11.3 Dickkopf1 (DKK1)	17
1.11.4 PITX1.....	18
1.12 Traitements de l'ostéoporose	18
1.12.1 Traitements classiques de l'ostéoporose	18
1.12.1 Nouvelles cibles thérapeutiques de l'ostéoporose	19
1.12.2 Autres approches possibles pour activer la signalisation de la voie Wnt/ β -caténine	
21	
1.13 Maladies parodontales.....	23
1.13.1 Définition de la maladie parodontale	23
1.13.2 Prévalence	24

1.13.3	Classification des parodonties.....	24
1.13.4	Les parodontites et les maladies systémiques	25
1.13.5	L'évaluation parodontale clinique	25
1.14	Ostéoporose et maladies parodontales.....	28
1.14.1	Ostéoporose et la perte de la densité osseuse des mandibules	28
1.14.2	Ostéoporose et la perte de la hauteur de la crête alvéolaire	30
1.14.3	Ostéoporose et la perte de l'attachement parodontale.....	30
1.14.4	Ostéoporose et la chute des dents	31
1.15	Facteurs de risques communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales..	32
1.16	Traitements d'ostéoporose ayant un effet sur les maladies parodontales	34
1.17	Gènes communs à l'ostéoporose et aux maladies parodontales.....	35
1.18	PITX1 : un gène de susceptibilité?	37
1.18.1	PITX1.....	37
1.18.2	Rôle de PITX1 dans la formation des membres inférieurs, des mandibules et des dents	38
1.18.3	Phénotype de la perte partielle et totale de fonction de PITX1.....	38
1.18.4	Les partenaires et les cibles de PITX1	39
1.18.5	La surexpression de PITX1 induit l'apoptose	40
1.18.1	PITX1, et son rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire.....	40
1.18.2	Le rôle de PITX1 dans les pathologies musculosquelettiques humaines.....	41
	Préface au chapitre 2	44
	Chapitre 2 : Article #1	45
	La surexpression du facteur de transcription PITX1 dans les ostéoblastes conduit à une diminution de la masse osseuse via l'inhibition de la voie de signalisation canonique Wnt	46
	Abstract.....	2
	Introduction.....	3
	Materials and Methods.....	4
	Results	9
	Discussion.....	16
	Figure Legends.....	19

References.....	23
Supplemental Data.....	25
Tables	28
Figures.....	30
Supplemental Figures	39
Préface au chapitre 3	41
Chapitre 3 : Article #2	42
La surexpression du facteur de transcription PITX1 dans les souris ostéoporotiques	
<i>Col1a1-Pitx1</i> induit une altération du phénotype dentaire et évoque une parodontite	43
Abstract.....	45
Introduction.....	46
Materials and Methods	47
Results	50
Discussion	54
References.....	60
Figure Legends	64
Figures.....	66
Supplemental Figures	71
Chapitre 4: Discussion.....	72
La surexpression du gène <i>Pitx1</i> au niveau des os entraîne une diminution de la formation	
et de la minéralisation osseuse	76
La surexpression du gène <i>Pitx1</i> induit une diminution de la différenciation cellulaire des	
cellules mésenchymateuse.....	79
La surexpression de <i>Pitx1</i> inhibe l'ostéoblastogenèse, l'odontoblastogenèse et la	
cémentoblastogenèse via l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine	80
La surexpression du gène <i>Pitx1</i> pourrait perturber en parallèle d'autre(s) voie(s) que la	
voie Wnt/ β -caténine	82

Contribution possible de Pitx1 dans la régulation de l'adipogenèse	85
Contribution possible de PITX1 dans la régulation de l'ostéoclastogenèse.....	87
Chapitre 5 : Perspectives et conclusion.....	91
Perspectives.....	92
Conclusion.....	95

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Introduction

Tableau 1: Gènes candidats impliqués dans la variation de la densité osseuse.	14
Tableau 2: Médicaments approuvés par le FDA pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose	19
Tableau 3: Relation entre la densité osseuse systémique et orale.....	29
Tableau 4: Relation entre l'ostéoporose et la hauteur de la crête alvéolaire.	30
Tableau 5: Relation entre l'ostéoporose et l'attachement parodontale.	31
Tableau 6: Relation entre l'ostéoporose et la chute des dents.	32
Tableau 7: Facteurs de risque communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales	33
Tableau 8: Traitements de la densité osseuse générale améliorant aussi les indicateurs de maladie parodontale.	35
Tableau 9: Gènes communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales	36

Chapitre 2: Article #1

Table 1: Oligonucleotides used for quantitative real time PCR	28
Table 2: Lithium treatment of transgenic <i>Colla1-Pitx1</i> mice improves trabecular bone architecture parameters.	29

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1: Classification des patients selon la valeur du T-score.....	8
Figure 2: L'activation et l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.	12
Figure 3: Parodontie dentaire.....	24
Figure 4: L'évaluation de la sévérité de la parodontie.....	26
Figure 5: Classification de Hamp afin de déterminer le degré de sévérité de la perte d'attache horizontale.....	27
Figure 6: Schéma résumant les mécanismes hypothétiques par lesquels la surexpression de Pitx1 pourrait induire les phénotypes décrits dans les deux manuscrits. En effet, la surexpression de Pitx1 induit l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en augmentant l'expression de DKK1, SOST et de GSK3. Conjointement, Pitx1 pourrait agir à travers d'autres voies tel que la voie des BMPs. Dans ce cas, la surexpression de Pitx1 pourrait inhiber la voie des BMPs directement en se fixant sur un promoteur d'un membre des BMPs ou indirectement à travers l'inhibition d'un ou de plusieurs autre(s) gène(s) ou voie(s). Ainsi, l'activation des SMADs via la liaison sur les récepteurs BMPR-I et BMPR-II sera inhibée (348, 349).....	90

Chapitre 2: Article #1

Figure 1 : Transgenic <i>Colla1-Pitx1</i> mice exhibit growth retardation accompanied with bone loss phenotype.....	30
Figure 2 : Transgenic <i>Colla1-Pitx1</i> mice exhibit an altered trabecular microarchitecture.	31
Figure 3 : Transgenic <i>Colla1-Pitx1</i> mice exhibit an altered cortical microarchitecture accompanied with a loss of bone strength.	32
Figure 4: Impaired <i>in vivo</i> osteoblast number derived from 12-week <i>Colla1-Pitx1</i> mice.	33
Figure 5: Impaired <i>in vitro</i> osteoblast differentiation derived from 12-week old <i>Colla1-Pitx1</i> mice when compared with their wild-type littermates.	34

Figure 6: MSCs derived from 12-week old <i>Colla1-Pitx1</i> mice displayed impaired osteoblast differentiation <i>in vitro</i> when compared with their wild-type littermates.	35
Figure 7 : Impaired <i>in vivo</i> osteoclast number and function of <i>Colla1-Pitx1</i> mice.....	36
Figure 8: Inactivation of the Wnt canonical pathway in <i>Colla1-Pitx1</i> mice.	37
Figure 9 : Transgenic <i>Colla1-Pitx1</i> mice treated with lithium chloride (LiCl) were protected from bone loss when compared with those untreated.	38

Supplemental Figures

Supplemental Figure 1: Impaired <i>in vivo</i> osteoblast function derived from 12-week old <i>Colla1-Pitx1</i> mice.	39
Supplemental Figure 1: MSCs derived from 12-week old <i>Colla1-Pitx1</i> mice displayed impaired adipocyte differentiation <i>in vitro</i> when compared with their wild-type littermates.....	40

Chapitre 3: Article #2

Figure 1: Osteoporotic <i>Colla1-Pitx1</i> mice display striking teeth defects.	65
Figure 2: Osteoporotic <i>Colla1-Pitx1</i> mice exhibit decreased jawbone density.....	66
Figure 3: Osteoporotic <i>Colla1-Pitx1</i> mice exhibit dental and periodontal defects accompanied with teeth loss phenotype.....	68
Figure 4: Decalcified tooth following staining with hematoxylin and eosin showed dental and periodontal defects in osteoporotic <i>Colla1-Pitx1</i> teeth.....	69
Figure 5: Decalcified tooth following staining with hematoxylin and eosin showed inflammation and root resorption phenotype.....	70

Liste des abréviations

ACTH	adrénocorticotropine
ACH	alveolar crest height
ABC	alveolar bone crest
ADN	acide désoxyribonucléique
Adipoq	adiponectin
AMEM	alpha Modification Eagle's Medium 1x
Ap2	adipocyte protein 2
AHSG	alpha 2-HS-glycoprotéine
Alp	alkaline phosphatase
APC	adenomatous polyposis coli
ARNm	acide ribonucléique messenger
β -caténine	bêta-caténine
BFR/BS	bone formation rate/bone surface
BMP2	bone morphogenetic protein 2
BMP4	bone morphogenetic protein 4
BMP9	bone morphogenetic protein 9
BrdU	5-bromodésoxyuridine
BSP	sialoprotéine osseuse
CaSR	récepteur-detecteur de calcium
CBF A1	facteur de liaison de base A1
CEJ	cemento-enamel junction
CFU	colony forming unit
CLCN7	canaux de chlorure
Ct.BV/TV	cortical bone volume density
Ct.BS/BV	cortical bone surface over bone volume
Ct.porosity	cortical porosity
Ct.Th	cortical thickness
CSF-1	colony-stimulating factor 1

CSPDs	cellules souches de la pulpe dentaire
CTSK	cathepsin K
COLA1	collagen type I alpha
COLA2	collagen type II alpha
CT	la calcitonine
CYP19	Aromatase
DEXA	dual-energy X-ray absorptiometry
DKK	Dickkopf
DMO	densité minérale osseuse
DUX 4	double homeobox, 4
DSPP	dentine sialophosphoprotéine
EDNRA	endothelin receptor type A
ER α	estrogen receptor alpha
ER β	estrogen receptor beta
ERM	epithelial rests of Malassez
FBS	Fetal bovine serum
FRZB	frizzled-related protein
FSH	hormone folliculo-stimulante
FSHD	dystrophie facio-scapulo-humérale
FSHB	follicle-stimulating hormone beta subunit
CGA	glycoprotein hormones, alpha polypeptide
GH1	growth hormon 1
GNRHR	gonadotropin-releasing hormone receptor
g/cm ²	gramme ou kilogramme par centimètre carré
GR	glucocorticoid receptor
GSK3- β	glycogène synthétase kinase 3 beta
Hh	Hedgehog
Hoxc 10	homeobox protein Hox-C10
Hoxc 11	homeobox protein Hox-C11
HTS	hormonothérapie substitutive
IGF1	insulin-like growth factor 1

IL1 α	interleukin 1 alpha
IL1 β	interleukin 1 beta
IL6	interleukin 6
Il-1ra	antagoniste du recepteur de l'interleukine-1
Ihh	Indian hedgehog
kpb	kilopaire de base
LEF	lymphoid enhancer-binding factor
LHX3	homeobox protein Lhx3
LHB	luteinizing hormone subunit beta
LiCl	lithium chloride
LLA	leucémie lymphoblastique aiguë
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5
LRP6	low density lipoprotein receptor-related protein 6
MAR	mineral appositional rate
MCF-7	michigan Cancer Foundation-7
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
Md	mandibular contact incisor
μ CT	micro-computed tomography
MMA	methyl metacrylate
Mg	Milligrame
Mm	Millimètre
MS/BS	mineralized surface to bone surface
MSCs	cellules mésenchymateuse
Mx	maxillary contact incisors
N	Newton
OA	ostéoarthrite
Ob.S/BS	osteoblast surface over bone surface
OCN	ostéocalcine
OMS	l'organisation mondiale de la santé
OPG	ostéoprogestérine

OPPG	osteoporosis-pseudoglioma syndrome
OPN	ostéopontine
OS/BS	osteoid surface over bone surface
Osx	Osterix
OV/BV	osteoid volume over the bone volume
p53	tumor protein p53
Parpγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PCR	polymerase chain reaction / réaction en chaîne par polymérase
PFA	paraformaldehyde
PRL	Prolactine
PGE2	prostaglandine E2
PLOD2	Proline lysine oxidase dehydrogenase-type collagenase
PITX1	paired-like homeodomain 1 (pituitary homeobox 1)
P1NP	propeptide N-terminal du procollagène de type I
POMC	pro-opio-mélanocortine
POU1F1	POU domain, class 1, transcription factor 1
PTH	parathyroid hormone
rhPTH	parathormone humaine recombinante
RA	récepteur d'androgène
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RASAL	RAS protein activator like
RCT	récepteur de la calcitonine
ROCQ	reconnaître l'ostéoporose et ses conséquences au Québec
RPTH1	récepteur 1 de l'hormone parathyroïdienne
RUNX2	runt-related transcription factor 2
RVD	récepteur de la vitamine D
Shh	sonic hedgehog
SOST	Sclérostine
SERM	modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes
siRNA	small interfering RNA
SMI	structure model index

SNP	single nucleotide polymorphism
SSTR2	somatostatin receptor type 2
Tb.BS/BV	trabecular bone volume
TB.Pf	trabecular pattern factor
Tb.Th	trabecular thickness
TBX1	T-box transcription factor TBX1
TBX4	T-box transcription factor TBX4
TCF	T cell factors
TERT	telomerase reverse transcriptase
TERC	telomerase RNA component
TG	Transgenic
TGF β	transforming growth factor beta
TNF α	facteur de nécrose tumorale alpha
TNFR2	récepteur du facteur de nécrose tumorale alpha
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
TSHB	thyrotropin-stimulating hormone beta
VDR	vitamin D receptor
WNT	wingless-type
WT	wild-type
3D	three dimensional

*Je dédie cette thèse à mes parents, qui ont
été une inspiration pour moi et qui m'ont
toujours encouragée dans tous ce que j'ai
entrepris. De même, je dédie cette thèse à
mon mari Gabriel Leduc pour son amour,
son encouragement et son soutien
inconditionnel ainsi qu'à nos merveilleux
fils David et Alexandre.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Alain Moreau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir cru en mon potentiel. Je suis très reconnaissante de la confiance qu'il m'a accordée pour la réalisation de mes différents projets à l'intérieur de mon programme de recherche. Il m'a laissé la liberté de tester toutes mes hypothèses, ce qui m'a permis de développer mon autonomie et mon esprit critique. Il m'a donné l'opportunité de présenter mes travaux de recherche dans de nombreux congrès nationaux et internationaux, et ainsi m'enrichir tant au niveau personnel que professionnel.

J'aimerais également remercier le Dr Benoît St-Jacques, pour avoir généré les lignées de souris transgéniques *Colla1-Pitx1* développant l'ostéoporose et les maladies parodontales.

Je tiens également à remercier le Dr Jean-Francois Lavoie pour ses conseils, son aide, son expertise et son souci du détail.

J'aimerais également remercier Josée Dépôt et Charlotte Zaouter pour leurs expertises et leur travail dans le domaine de l'histologie.

Je remercie tous mes collègues dont j'ai eu particulièrement le plaisir de côtoyer:

Anita Franco, qui m'a supportée dans les moments les plus difficiles tant au niveau professionnel que personnel, plus qu'une collègue, elle a été une soeur pour moi. Merci d'avoir été là pour moi.

Lakshmi Suvarnan, qui m'a appris beaucoup sur la culture indienne. Elle a été une très bonne amie et d'une compagnie agréable. Sa présence permettait toujours de faire passer le temps plus vite. Merci beaucoup 'Lakshmou'.

Dina Nada, l'image de la femme percevérante. Elle a été une très bonne amie et d'une compagnie agréable. Merci beaucoup pour ton support, ton encouragement et ton amitié précieuse.

Niaz Olia, qui me disait toujours que mon optimisme est contagieux. Merci 'Besty' de m'avoir supporté, je sais que je te taquinais beaucoup, mais c'était par amour.

Dre Marie-Yvonne Akoume, qui a toujours été là pour écouter mes hypothèses et m'encourager. Merci beaucoup pour ton support et ton amitié précieuse.

Dr Mohamed Elbakry, le père de la morale, a été comme un grand frère pour moi. Merci beaucoup pour ton support et ton amitié.

Lauriane Bernard, ce n'est pas facile de trouver des vraies amies. Merci Lolo pour ton amitié et pour les bons moments qu'on a passé ensemble.

Qing Yuan, la gentillesse même. Merci beaucoup pour ton encouragement et ton amitié.

Mamadou Boiro, qui a été un très bon ami, il m'a souvent tenu compagnie quand je travaillais tard au laboratoire. Merci pour ta compagnie agréable et ton amitié.

Dre Cynthia Picard, une personne d'une compagnie agréable. Merci beaucoup pour ton amitié.

Dr Martin Pellicelli, lors de mon arrivée au sein de l'équipe et au Québec, il a été le premier à me montrer toutes les techniques utilisées dans le laboratoire. De plus, il m'a appris beaucoup sur la culture québécoise (la bière et la cabane à sucre). Merci beaucoup pour tous tes conseils scientifiques et ton amitié.

Dre Kristen Fay Gorman, d'une compagnie agréable. Merci beaucoup pour ton amitié.

Dr DaShen Wang, qui me disait toujours « ton sourire laisse croire que le monde est sans problème ». Merci pour ton amitié et ta bonne humeur.

Merci à tous pour avoir rendu l'atmosphère de travail si agréable, je vais garder de très bons souvenirs de ces années.

Je souhaite remercier tout particulièrement mon mari, qui est un homme formidable. Merci pour ton aide, ton amour, ton encouragement et ton soutien inconditionnel. Je souhaite remercier également mes fils David et Alexandre pour leur présence qui ajoute un très grand bonheur dans ma vie. Je remercie également mes parents, Michel et Marie, qui sont des parents extraordinaires. Merci pour votre amour, votre dévouement, et votre encouragement. Cette thèse est pour vous. Merci à mon frère Pierre qui a beaucoup facilité mon intégration dans ce pays et m'a soutenu tout le long de ces années. Merci pour ton amour, ton encouragement et ton soutien. Merci également à ma soeur Josette pour son amitié, son amour et ses encouragements.

Aussi, un merci au personnel administratif du centre de recherche du CHU Sainte-Justine particulièrement Dominika Kozubska et Sandy Lalonde et du département de biochimie de l'Université de Montréal particulièrement Sylvie Beauchemin.

Finalement, je voudrais remercier les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer cette thèse :

Dr Gerardo Ferbeyre, président-rapporteur

Dr Stéphane Roy, membre du jury

Dr Alain Moreau, membre du jury

Dr Pierre Moffatt, examinateur externe (Université McGill)

Dr Guillaume Lettre, représentant de la Doyenne de la Faculté de médecine

Merci à tous !

I Introduction thèse

1.1 Objectif et hypothèse de travail

L'objectif général de la présente thèse est la caractérisation du rôle du facteur de transcription PITX1 dans l'étiologie de l'ostéoporose et des maladies parodontales. Plus concrètement, notre hypothèse est que la surexpression du gène *Pitx1* joue un rôle dans le développement de l'ostéoporose et des maladies du parodonte via l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

1.2 Organisation de la thèse

Cet ouvrage est divisé en quatre sections. Outre le présent chapitre faisant office d'introduction, les chapitres 2 et 3 présentent les résultats découlant des projets de recherche sous la forme de deux articles scientifiques. Finalement, au chapitre 4, les résultats sont discutés en lien avec la littérature scientifique existante. À la fin de ce chapitre, des interventions visant à améliorer le dépistage et le traitement de l'ostéoporose et des maladies parodontales ainsi qu'une conclusion globale de ce travail sont présentées.

Chapitre 1 : Introduction

1.3 Définition de l'ostéoporose

L'ostéoporose est un mot d'origine grecque οστούν/ostoun qui veut dire "os" et πόρος/poros qui veut dire "poreux". En 1993, durant une conférence éditée par l'OMS, l'ostéoporose a été définie comme étant une maladie généralisée du squelette, caractérisée par une densité osseuse diminuée et des altérations de la microarchitecture osseuse, responsable d'une fragilité osseuse exagérée et d'un risque élevé de fracture (1). Cette définition a été simplifiée en 2001 pour devenir; l'ostéoporose est reconnue comme une maladie générale du squelette, caractérisée par une diminution de la résistance osseuse prédisposant le patient à un risque accru de fractures (2). La résistance osseuse est déterminée d'une part par la quantité du tissu osseux et d'autre part par sa résistance mécanique, qui elle dépend de la microarchitecture (3).

1.4 Prévalence de l'ostéoporose

La prévalence de l'ostéoporose est plus élevée chez les femmes que chez les hommes et augmente avec l'âge. Exceptionnellement les enfants peuvent en être victimes. L'ostéoporose touche une femme sur quatre et un homme sur huit de 50 ans et plus (4). Cette proportion augmente à une femme sur deux après 80 ans (5, 6). Selon l'agence de la santé publique du Canada, en 2009, 1,5 million de personnes, soit 10% de la population, âgés de 40 ans et plus étaient atteintes d'ostéoporose. Le risque accru de fracture lié à l'ostéoporose est une grande préoccupation à cause des répercussions financières importantes sur le système de santé. En 2010, le coût annuel du traitement des fractures causées par l'ostéoporose était de 2.3 milliards de dollars canadiens soit 1.3% du budget total de la santé (7). L'ostéoporose constitue un problème de santé publique majeur compte tenu du vieillissement de la population et des conséquences importantes des fractures au niveau de la mortalité, la morbidité et les coûts du système de santé. Vu la grande prévalence de cette maladie et le vieillissement de la population, il est à prévoir que l'ostéoporose deviendra un problème de santé publique de plus en plus important.

La fracture ostéoporotique est la principale conséquence de l'ostéoporose. Environ 40 % des femmes blanches de 50 ans au Canada subiront une fracture ostéoporotique à un moment ou l'autre au cours de leur vie (8). Il est à noter que, 20 % des femmes victimes d'une fracture de hanche meurent dans l'année qui suit. Les fractures de la hanche et des vertèbres réduisent la survie de cinq ans dans une proportion semblable (9, 10).

1.5 Variation de la masse osseuse au cours de la vie

Selon le rapport de l'agence de la santé publique du Canada, publié en 2006, la masse osseuse augmente rapidement pendant la croissance jusqu'à atteindre un sommet dans la vingtaine, un peu plus tôt chez les femmes que chez les hommes. La masse osseuse acquise à la fin de la période de croissance amputée de la perte osseuse qui suit définit le capital osseux d'un individu. La masse osseuse se maintient à son maximum pendant une vingtaine d'années. Après celles-ci, la masse osseuse décroît progressivement au rythme de 0.5 à 1% par an. Cette perte osseuse physiologique est attribuée au vieillissement cellulaire osseux, en particulier des fonctions ostéoblastiques (11). Chez les hommes, la perte osseuse se poursuit au même rythme, aboutissant à une perte globale d'environ 27 % de la masse osseuse (12). Par contre, les femmes subissent une brutale accélération de perte osseuse au rythme de 1 à 3% par an quelques années avant la ménopause. La perte se poursuit durant 8 à 10 ans, puis ralentit jusqu'à ce que son rythme soit le même que chez l'homme (1). L'amplification de cette perte osseuse est plus marquée durant les trois premières années et touche préférentiellement l'os trabéculaire. Cette perte osseuse aboutit à une réduction globale de 40% de la masse osseuse (12). Vers la soixantaine, on observe un ralentissement de la perte osseuse, qui reste cependant plus importante chez la femme que chez l'homme. Après 70 ans, cette perte peut s'accélérer à nouveau chez les femmes comme chez les hommes et est principalement due au vieillissement.

1.6 Physiologie osseuse et pathophysiologie de l'ostéoporose

Le squelette est un organe dynamique. Les os sont continuellement renouvelés par un processus de remodelage pour remplacer le vieux tissu osseux par du nouvel os. Le remodelage osseux sert à assurer tout au long de la vie trois fonctions majeurs: (1) l'adaptation de la géométrie et de la masse osseuses aux contraintes de la croissance, de la locomotion et de l'exercice; (2) la réparation des micro-dommages intra-osseux ainsi que (3) l'homéostasie calcique pour laquelle le squelette sert de réservoir. Le remodelage est assuré par les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse et les ostéoblastes qui en synthétisent une nouvelle (11). Un déséquilibre du couplage entre la résorption et la formation osseuse a des répercussions importantes sur la microarchitecture et la masse osseuse. Ce déséquilibre peut conduire à long terme à une perte de l'intégrité de la structure du squelette engendrant des fractures (13). Un déséquilibre du couplage peut être causé par une ou plusieurs conditions physiologiques. Une incapacité à atteindre le pic osseux optimal durant la croissance, une augmentation du taux de résorption osseuse, et une formation insuffisante de tissu osseux en réponse à la résorption osseuse durant le remodelage peuvent induire une ostéoporose (14, 15).

1.7 Types d'ostéoporose

On distingue deux principaux types d'ostéoporose : l'ostéoporose primaire et l'ostéoporose secondaire.

1.7.1 L'ostéoporose primaire

L'ostéoporose primaire est liée à l'âge. Elle est la forme la plus fréquente. Elle touche 8 à 18 % des femmes de plus de 50 ans et 5 à 6 % des hommes du même âge. En générale, elle fait référence à l'ostéoporose causée par une déficience en vitamine D due au vieillissement. Elle est plus fréquente chez les femmes ménopausées, en raison de la

chute hormonale en œstrogènes. Les estrogènes contrôlent le remodelage osseux en diminuant la résorption et en augmentant la formation osseuse (3, 16). On peut distinguer deux types d'ostéoporose primaire ; l'ostéoporose de type I ou trabéculaire et l'ostéoporose de type II ou corticale.

1.7.1.1 L'ostéoporose de type I ou trabéculaire :

Elle est également appelée post-ménopausique, parce qu'elle touche surtout les femmes entre 60 et 65 ans. Cette ostéoporose atteint en particulier l'os trabéculaire. Elle est caractérisée par l'amincissement des travées osseuses et les pertes de connection. Son expression caractéristique se manifeste par le tassement des vertèbres.

1.7.1.2 L'ostéoporose de type II ou corticale:

Elle est également appelée sénile, parce qu'elle se voit particulièrement chez les sujets âgés de 75 ans et plus. Elle est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes avec un ratio de 2:1. Cette ostéoporose atteint en particulier l'os cortical : elle est caractérisée par un amincissement et une augmentation de la porosité de ce dernier. Son expression caractéristique se manifeste par la fracture du col du fémur. Chez les personnes âgées, les deux types d'ostéoporoses sont associés. L'ostéoporose trabéculaire apparaît plus précocement. Si l'ostéoporose est induite par certaines pathologies ou certains traitements, on parle d'ostéoporose secondaire.

1.7.2 L'ostéoporose secondaire

L'ostéoporose secondaire peut atteindre les gens de tout âge. Elle peut être induite par certaines pathologies ou par certains traitements (13, 16). Bien que la majorité des cas d'ostéoporose chez les femmes soient d'origine primaire, on estime que 30% de ces femmes présentent également d'autres conditions pouvant avoir contribué à la perte osseuse (13, 16). Chez les hommes l'ostéoporose secondaire compte pour 40 à 60 % des cas d'ostéoporose (13).

1.8 La mesure de la densité minérale osseuse (DMO)

La densité minérale osseuse (DMO) constitue un paramètre clé dans le diagnostic de l'ostéoporose. C'est la variable la plus quantifiable du risque de fracture. La DMO est mesurée par une technique appelée absorptiométrie biénergétique munie de deux émetteurs de rayons X, aussi connue par DEXA, pour dual-energy X-ray absorptiometry. D'autres techniques ont été développées, telles que l'ultrasonographie quantitative, la tomographie quantitative périphérique et l'absorptiométrie monoénergétique à rayons X, mais la DEXA reste la méthode la plus recommandée car elle est la plus précise (17, 18). Étant donné que les tests ne sont pas tous égaux et comparables et que les différents appareils de mesure n'ont pas de standard commun, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a établi en 1994 une méthode pour un bon diagnostic. Ce diagnostic repose sur une comparaison entre la DMO du patient et la DMO moyenne d'une population de jeunes adultes de la même ethnie et du même sexe (1). Le nombre d'écarts-types au dessus ou au dessous de la DMO moyenne normale correspond à un score T, assigné à chaque patient. Selon la valeur du score T le patient sera classé dans une des quatre catégories définie par l'OMS. Par exemple, chez les femmes ménopausées caucasiennes, on parle d'ostéoporose si cette densité est en dessous de -2.5 déviations standard par rapport à la normale. Ces patientes sont considérées atteintes d'ostéoporose sévère quand elles présentent une ou plusieurs fractures de fragilisations. Entre -2.5 et -1 déviations standard, on parle d'ostéopénie. Une déviation standard moindre que 1 signifie qu'une personne est normale (1).

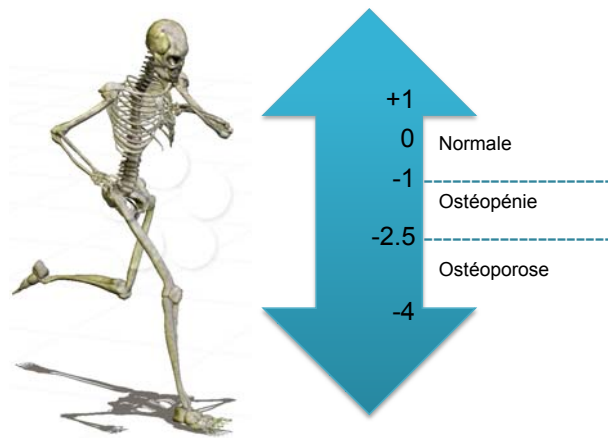


Figure 1: Classification des patients selon la valeur du T-score.

Auparavant, le diagnostic de l'ostéoporose reposait uniquement sur la mesure de la DMO. Plusieurs études ont montrée qu'une grande proportion des fractures survenaient chez des femmes considérées normales ou ostéopéniques selon la classification de l'OMS (19, 20). Depuis 2005, Ostéoporose Canada recommande l'évaluation du risque de fracture sur une période de 10 ans. Cette évaluation tient compte non seulement de la DMO, mais également de plusieurs autres facteurs de risque clés. En effet, l'âge, le sexe, le tabagisme, la consommation d'alcool, l'antécédent de fracture de fragilisation et/ou l'administration à long terme de glucocorticoïdes oraux sont maintenant considérés essentiels pour une bonne évaluation (18).

1.9 Facteurs de risque de l'ostéoporose

Des facteurs génétiques, environnementaux et hormonaux déterminent l'acquisition du capital osseux pendant la croissance, puis la perte osseuse avec l'âge. Les risques de fractures ostéoporotiques ne sont pas indépendants les uns des autres; mais sont plutôt additifs, l'âge, le sexe et l'éthnicité sont des paramètres importants qui doivent toujours être pris en considération (17, 21). Certaines maladies interfèrent également avec le métabolisme osseux et peuvent causer une ostéoporose secondaire.

1.9.1 Le sexe, l'âge et l'éthnicité

L'origine ethnique, ainsi que l'âge et le sexe, influencent la fréquence de l'ostéoporose. En effet, l'incidence de fracture augmente exponentiellement à mesure qu'on avance en âge. En vieillissant, l'épaisseur de l'os corticale diminue de manière significative chez les femmes. Tandis que la porosité de l'os corticale augmente de façon égale chez les femmes et chez les hommes à partir de 40 ans. De plus, avec l'âge, la quantité d'os déposé lors du remodelage osseux diminue alors que la résorption reste identique. Ce déséquilibre engendre une diminution de la masse osseuse trabéculaire (3). Entre la 20^{ème} et la 80^{ème} année, on estime que les femmes perdent près de 40% de leur capital osseux contre 27% chez les hommes (12). La probabilité de subir une fracture sur une période de 10 ans, entre l'âge de 45 et 85 ans, augmente de huit fois chez les femmes et de cinq fois chez les hommes (22).

En outre, l'ostéoporose se développe chez des personnes de toute race et appartenance ethnique. Cependant, les afro-américains tendent à avoir un risque plus faible que d'autres groupes ethniques étudiés.

1.9.2 Facteurs génétiques

L'hérédité est le facteur le plus important du capital osseux accumulé en fin de croissance. L'acquisition du capital osseux est principalement déterminé par des facteurs génétiques, avec un déterminisme génétique variant de 70 à 85% (23). On n'a cependant pas pu identifier un gène unique de l'ostéoporose; c'est une maladie multigénique (24). Des études familiales comparant la masse osseuse de paires de jumeaux homozygotes ou dizygotes font apparaître que entre 50 et 85 % de la variabilité du pic de masse osseuse sont dus à des facteurs génétiques dépendamment du site et de l'âge des sujets étudiés (25-28). Des études génétiques ont mis en évidence l'effet de déterminants génétiques sur d'autre principaux facteurs de risques de fractures ostéoporotiques, tels que les propriétés ultrasoniques de l'os (29), la géométrie du col fémorale (29), la force musculaire (30), les marqueurs du remodelage osseux (31), et l'indice de masse corporelle (32). Le rôle des facteurs génétiques dans la pathogenèse de la perte osseuse n'est pas très clair. Par

ailleurs, un des plus importants facteurs induisant la perte osseuse chez les femmes est la carence en estrogènes à la ménopause. Les études antérieures ont montré que l'âge de la ménopause est génétiquement déterminé (33). Cependant, les études sur la contribution génétique à la perte osseuse liée à l'âge ont donné des résultats mitigés (34, 35). D'autre part, des études génétiques ont mis en évidence l'effet des déterminants génétiques sur le risque de fracture. Plusieurs gènes ont été identifiés comme candidats potentiels de la régulation de la masse osseuse et du risque de fractures ostéoporotiques. Les gènes candidats les plus étudiés et ceux qui ont un impact sur les principales voies de signalisation du tissu osseux seront développés plus tard dans le Tableau 1.

1.9.3 Facteurs environnementaux

Certains facteurs liés aux comportements alimentaires peuvent accélérer la perte de masse osseuse, citons la consommation excessive de la caféine ou d'alcool, la déficience en calcium et vitamine D, l'excès ou la déficience en protéine alimentaire, de même que l'administration chronique de glucocorticoïdes oraux. D'autres habitudes de vie peuvent y contribuer, comme le manque d'activité physique ou le tabagisme.

1.9.4 Facteurs hormonaux

La ménopause précoce, avant l'âge de 45 ans, est un facteur important dans la détermination de la perte osseuse. Chez les femmes, après la ménopause, les niveaux en estrogènes diminuent de plus de 90%, ce qui entraîne une augmentation de la perte osseuse pouvant atteindre 30% de la densité osseuse en une dizaine d'années (36). En effet, la déficience en estrogènes entraîne un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse. Ce déséquilibre induit une cascade de perturbations moléculaires engendrant, d'une part, une augmentation de la résorption osseuse liée à une augmentation du recrutement de l'activité et la durée de vie des ostéoclastes, et d'autre part, à une réduction de la formation osseuse liée à une diminution de la durée de vie des ostéoblastes (11, 14).

Les estrogènes agissent également comme un puissant inhibiteur de la résorption en bloquant la production de facteurs pro-ostéoclastiques tels que le RANKL, l'IL-1, l'IL-6, le TNF α , M-CSF, la PGE2, et en favorisant celle de facteurs anti-ostéoclastiques tel que l'OPG et le TGF- β (37). Lors d'un déséquilibre de ces facteurs, les lacunes osseuses ne sont pas comblées par du nouveau tissu osseux, et les travées osseuses s'amincissent puis se perforent, fragilisant l'os et diminuant sa résistance mécanique. Le bilan du cycle de remodelage osseux devient négatif et conduit à la perte du tissu osseux (3). Chez les hommes, le niveau circulant de testostérone diminue avec l'âge. Cette diminution peut avoir un effet négatif sur la masse osseuse puisque la testostérone stimule les ostéoblastes et inhibe les ostéoclastes. De ce fait, l'hypogonadisme représente une cause fréquente d'ostéoporose secondaire chez les hommes (21).

1.9.5 Maladies associées à l'ostéoporose

Certaines maladies endocriniennes (l'hyperparathyroïdie primaire, la thyrotoxicose, le syndrome de Cushing et la maladie d'Addison) (38), hématologiques (le myélome multiple, la mastocytose systémique, le lymphome, la leucémie, l'anémie pernicieuse) (39-42), rhumatologiques (la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante) (43, 44), gastrointestinaux (syndrome de malabsorption de nutriments, maladie chronique du foie) (45), du comportement (l'autisme) (46-48) ou autres interfèrent avec le métabolisme osseux et conduisent à une ostéoporose secondaire.

1.10 Voie de signalisation Wingless (Wnt) dans l'ostéoporose

Au cours des dernières années, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine a été reconnue comme un régulateur clé de l'homéostasie osseuse. D'ailleurs, la régulation des ostéoblastes se base essentiellement sur cette voie. En effet, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine favorise la différenciation ostéoblastique à partir de leurs progéniteurs, stimule la prolifération des ostéoblastes et augmente la survie des ostéoblastes et des ostéocytes en diminuant leur apoptose (49).

La voie de signalisation Wnt comprend de nombreux acteurs. Le rôle précis de certains de ces acteurs demeure encore à être élucidé. Cependant, des progrès substantiels ont été effectués durant les dernières années afin de mieux comprendre les mécanismes d'activation et d'inhibition de cette voie. Il existe deux types de voies de signalisation Wnt la voie non-canonique et la voie canonique. La première implique Frizzled-2 comme récepteur et une libération des sous unités bêta/gamma de protéines G induisant une activation de la phospholipase C et une mobilisation du calcium intracellulaire (50). À côté de cette voie de signalisation, il existe une deuxième voie de signalisation des protéines Wnt via la β -caténine qui est appelée canonique (c'est-à-dire la voie privilégiée).

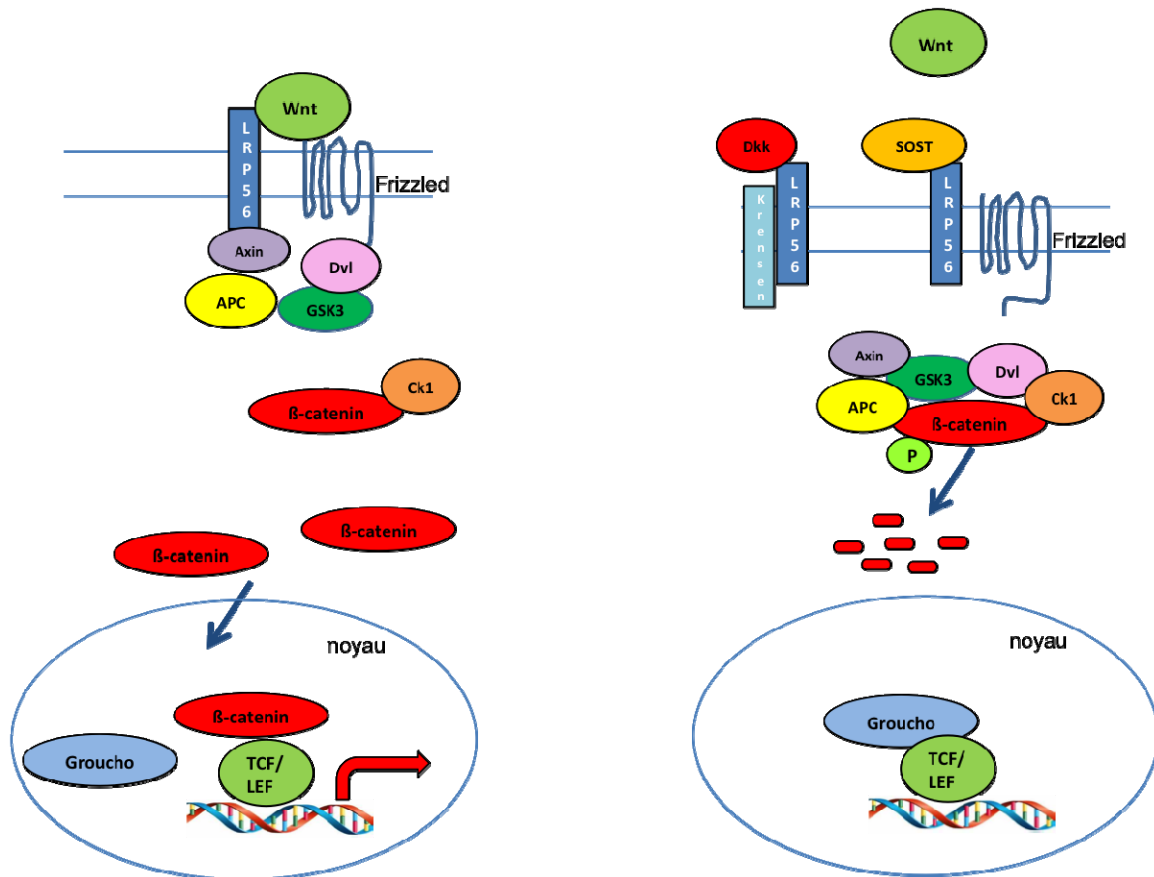


Figure 2: L'activation et l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

La voie Wnt/ β -caténine implique le récepteur LRP5 situé sur la membrane cellulaire ostéoblastique au milieu de deux autres récepteurs Frizzled et Kremen. Frizzled

est un récepteur à sept domaines transmembranaires comportant une région riche en cystéine, sur sa partie extracellulaire, capable de lier Wnt à LRP5. D'autre part, Kremen est un récepteur comportant une partie extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire capable de lier Dickkopf (DKK1) à LRP5 (51-54). Lorsque Wnt se lie à Frizzled et LRP5/6, le site PPPSP situé sur la partie intramembranaire de LRP5/6 est phosphorylé, ce qui permet la fixation d'Axin sur ce site (55). La formation du complexe Axin-APC (Adenomatous polyposis coli)-GSK3 (glycogène synthétase kinase 3) inhibe la phosphorylation de la β -caténine par la caséine kinase I alpha, empêchant sa dégradation par le processus d'ubiquitination (56, 57). La β -caténine se dirige par la suite dans le noyau de la cellule et interagit avec des régulateurs de la transcription tels LEF (lymphoid enhancer-binding factor 1) et/ou TCF (T cell factors, TCF1, 3 et 4) activant ainsi de nombreux gènes. Cela se traduit par une accentuation de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes, par une activation de l'activité des ostéoblastes et par une réduction du taux d'apoptose des ostéoblastes et des ostéocytes, ce qui a pour conséquence finale une augmentation significative de la formation osseuse et de la masse osseuse (49). En absence de Wnt, le complexe Axin-GSK3-APC se lie à la β -caténine qui va être phosphorylée et subir le processus d'ubiquitination (58). En revanche, la voie de signalisation peut être inhibée par interférence avec le complexe de récepteurs LRP5/FZD. DKK-1 (se lie à kremen et à LRP5/6) et la sclérostine (SOST) (se lie à LRP5/6), provoquant une inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (53). Les facteurs DKK-1 et SOST exercent une inhibition compétitive de la liaison de Wnt à LRP5/FZD et contrôlent ainsi la différenciation et l'activité des ostéoblastes. Wnt ne pouvant plus se lier qu'à Frizzled, LRP5/6 n'étant plus disponible; ainsi, l'absence de co-récepteur inactive la voie de signalisation et par la même occasion la formation osseuse, induisant ainsi une ostéoporose (58).

1.11 Gène de susceptibilité de l'ostéoporose

Plusieurs gènes semblent avoir une influence sur la densité osseuse et l'ostéoporose. Les gènes candidats impliqués dans la physiopathologie de l'ostéoporose les plus étudiés sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Gènes candidats impliqués dans la variation de la densité osseuse.

Classification biologique	Gène candidat	Protéine	Localisation sur le chromosome	Référence
Hormones et récepteurs	VDR	Le récepteur de la vitamine D	12q12-14	Morrison et al. 1994 (59)
	ESR1	Le récepteur d'estrogène alpha	6q25	Sano et al. 1995 (60)
	ESR2	Le récepteur d'estrogène beta	14q22-24	Ogawa et al. 2000 (61)
	CALCA	La calcitonine	11p15	Miyao et al. 2000a (62)
	CALCR	Le récepteur de la calcitonine	7q21	Masi et al. 1998 (63)
	PTH	Hormone parathyroïdienne	11p15	Hosoi et al. 1999 (64)
	PTHr1	Le récepteur 1 de l'hormone parathyroïdienne	3p22-21	Minagawa et al. 2002 (65)
	CYP19	Aromatase	15q21	Masi et al. 2001(66)
	GR	Le récepteur des glucocorticoïdes	5q31	Huizenga et al. 1998(67)
	CaSR	Récepteur-detecteur de calcium	3q13-21	Tsukamoto et al. 2000a (68)
	AR	Récepteur d'androgène	Xq11-12	Sowers et al. 1999 (69)
Cytokines et récepteurs	IL1B	Interleukine-1	2q14	Chao et al. 2010 (70)
	IL1RI	Antagoniste du recepteur de l'interleukine-1	2q14	Keen et al. 1998 (71)
	IL6	Interleukine-6	7p21	Murray et al. 1997 (72)
	TNF α	Facteur de nécrose tumorale α	6p21	Fontova et al. 2002 (73)
	TNFR2	Récepteur du facteur de nécrose tumorale α	1p36	Spotila et al. 2000 (74)

Classification biologique	Gène candidat	Protéine	Localisation sur le chromosome	Référence
Les composants de la matrice osseuse	AHSG	alpha 2-HS-glycoprotéine	3q27	Dickson et al. 1994 (75)
	COLIA1	Collagen type I alpha1	17q21-22	Grant et al. 1996 (76)
	COLIA2	Collagen type I α 2	7q22	Lau al. 2004 (77)
	BGP	Osteocalcine	1q25-31	Dohi et al. 1998 (78)
Régulateurs d'ostéoblastes	BMP2	Bone morphogenic protein 2	20p12	Medici et al. 2006 (79), Stykarsdottir et al. 2003 (80)
	BMP4	Bone morphogenic protein 4		Ramesh et al. 2005 (81)
	RUNX2	Runt-related transcription factor 2	6p21	Vaughan et al. 2002 (82), 2004 (83), Doecke et al. 2006 (84)
	IGF-1	Insulin like growth factor 1	12q22-24	Miyao et al. 1998 (85)
	SOST	Sclérostine	17q11.2	Uitterlinden et al. 2004 (86)
	TGF β 1	Transforming growth factor β 1	19q13	Langdahlet al. 1997 (87)
	LRP5/6	Lipoprotéine-related receptors 5/6	11q13.4 12p13.2	Ferrari et al. 2004, (88, 89)
	DKK1	Dickkopf-1	10q11.2	Li et al. 2006, Wang et al. 2008 (90, 91)
	PITX1	Paired-like homeodomain 1	5q31	Mak et al 2004 (92)
Gènes reliés aux ostéoclastes	CTSK	Cathepsin K	1q21	Giraudeau et al 2004 (93)
	OPG	Ostéoprogesterine	8q24	Arko et al. 2002 (94)

1.11.1 Low-density lipoprotein receptor (LPR5 et LPR6)

Plusieurs mutations sur les gènes *LPR5* et *LPR6* (*low-density lipoprotein receptor*) semblent corrélées avec un risque accru d'ostéoporose. Plusieurs études ont

souligné le rôle prédominant de la région chromosomique localisée en 11q12-13 dans la régulation de la masse osseuse tel que le syndrome de OPPG (ostéoporose avec pseudogliome) (95), le phénotype familial de la densité minérale osseuse très élevée (96), et la distribution normale de la densité minérale osseuse dans la population générale (97).

De récentes études ont identifié des mutations dans le gène LRP5 comme étant responsable des deux maladies humaines rares: l'OPPG et le syndrome de la densité minérale osseuse très élevée (98, 99). L'OPPG est une condition génétique autosomique récessive caractérisée par une ostéoporose sévère (95). Tandis que, le syndrome de la densité minérale osseuse très élevée est une condition génétique autosomique dominant caractérisée par une augmentation de la densité minérale osseuse (96). Les mécanismes conduisant aux deux phénotypes cliniques opposés sont expliqués par le fait que toute mutation empêchant la liaison de Wnt à LRP5 va entraîner une perte de fonction du récepteur induisant une perte osseuse et une ostéoporose pseudogliome (98). Au contraire, une mutation empêchant la liaison de DKK1 à LRP5 va entraîner un gain de fonction du récepteur induisant une masse osseuse très élevée (100). Des souris génétiquement modifiées porteuses de la mutation humaine au niveau du gène LRP5 (G171V), remplaçant une glycine par une valine, présentent également une masse osseuse très élevée accompagnée d'un épaissement mandibulaire (101). Différentes autres mutations au niveau du gène LRP5 sont associées à une augmentation de la masse osseuse (102). LRP5 est un des gènes majeurs dans la régulation de l'acquisition de la masse osseuse. Il semble non seulement moduler le niveau de formation osseuse mais aussi le couplage cellulaire entre les ostéoblastes et les ostéoclastes en agissant sur la voie RANK-RANKL et OPG (100, 103).

1.11.2 Sclérostine (SOST)

La sclérostine (SOST) est produite au niveau osseux par les ostéocytes. Celle-ci joue le rôle de régulateur négatif de l'ostéoformation. Dans des modèles murins, un déficit en sclérostine reproduit la maladie humaine d'hyperproduction osseuse (104), alors que les souris transgéniques qui surexpriment la sclérostine humaine ont une faible masse osseuse et une grande susceptibilité aux fractures (105). La SOST, se lie aux

récepteurs LRP5/6 induisant l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine engendrant par la suite une diminution de la formation osseuse (106, 107). La sclérostine a d'abord été identifiée comme un régulateur de la masse osseuse par des études de cartographie génétique des deux maladies sclérosantes rares, la sclérostéose et la maladie de Van Buchem. Les deux maladies se caractérisent par une ostéosclérose progressive affectant principalement le crâne, la mandibule et les os des extrémités. La sclérostéose est la forme la plus sévère. Elle est associée à des malformations des mains tels qu'une dysplasie, syndactylie ou une déviation radiale des phalanges (108). L'analyse génétique de ces deux maladies montre qu'elles sont localisées sur un même gène, situé sur le chromosome 17q12-21, le gène SOST qui code pour la sclérostine (109, 110).

En 2001, une mutation récessive de perte de fonction au niveau du gène SOST a été identifiée comme la cause de la sclérostéose (111, 112). En revanche, une délétion homozygote de 52 Kpb du même gène a été identifiée comme la cause de la maladie de Van Buchem (113). Des travaux ont montré par la suite que cette région délétée joue un rôle clé dans la régulation de la masse osseuse (114). Les porteurs hétérozygotes de ces mutations sont asymptomatiques, ils présentent une augmentation significative de leur DMO, sans provoquer des effets indésirables (115). Des polymorphismes dans le promoteur et la région supprimée de 52 Kpb ont été associés à la DMO (116). Une autre étude avec un groupe d'âge plus jeune n'a pas réussi à trouver une association (117).

1.11.3 Dickkopf1 (DKK1)

DKK1 est également un inhibiteur endogène de la signalisation Wnt. DKK1 joue un rôle essentiel dans la régulation de la masse osseuse. En effet, chez les femmes postménopausées, des taux sériques de DKK1 plus élevés que chez les sujets témoins ont été mis en évidence (118). De plus, une mutation empêchant la liaison de DKK1 à LRP5 entraîne un gain de fonction du récepteur induisant une masse osseuse très élevée (100). D'autres études soutiennent l'implication de DKK1 dans l'homéostasie osseuse; la perte de la densité et de la force mécanique osseuse induite suite à une ovariectomie ont été abrogées par des oligonucléotides antisens DKK1 (119). D'un autre part, l'inhibition de l'expression de DKK1 retarde l'ostéopénie induite par l'administration des

glucocorticoïdes (91). Dans des modèles animaux, des souris transgéniques qui surexpriment DKK1 présentent une perte sévère de masse osseuse (90). Tandis que, les souris déficientes en DKK1 présentent une augmentation de la densité osseuse (120).

1.11.4 PITX1

L'implication de PITX1 dans le développement de l'ostéoporose découle de l'observation que chez des jumelles monozygotiques discordantes pour l'ostéoporose (l'une atteinte l'autre pas), le gène le plus surexprimé au niveau des ostéoblastes de la jumelle ostéoporotique était *Pitx1* avec une augmentation de 8,6 fois de son niveau d'expression lorsque comparé à son niveau d'expression chez ostéoblastes de la jumelle non-ostéoporotique (92).

1.12 Traitements de l'ostéoporose

Le traitement de l'ostéoporose est individualisé à la fois en ce qui concerne la décision d'initier un traitement médicamenteux et le choix du principe pharmacologique.

1.12.1 Traitements classiques de l'ostéoporose

Au-delà des traitements classiques de l'ostéoporose qui, soit inhibent le remodelage osseux (biphosphonates, modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes), soit le stimulent en faveur de la formation (PTH, tériparatide), l'élucidation des mécanismes moléculaires de remodelage osseux a conduit au développement de nouveaux inhibiteurs de la résorption, tels que l'anticorps monoclonal humain dénosumab, qui antagonise RANKL, un facteur indispensable à l'ostéoclastogenèse, et l'odanacatib, un antagoniste de la cathepsine K, une enzyme de dégradation du collagène. Le tableau ci-dessous résume la liste de plusieurs médicaments utilisés dans le traitement de l'ostéoporose.

Tableau 2: Médicaments approuvés par le FDA pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose

Classe	Mécanisme d'action	Médicament	Indication
Bisphosphonates	Inhibe l'enzyme farnésyl-pyrophosphate synthase indispensable à la fonction des ostéoclastes (121).	Alendronate (Fosamax)	Traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées et la maladie osseuse de Paget.
		Ibandronate (Boniva)	Par Roche/GlaxoSmithKline, approuvé en Mai 2003.
		Acide zolédronique (Reclast)	Pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopausale.
Modulateurs sélectifs des récepteurs des œstrogènes (SERM)	Ils ont les mêmes effets que les oestrogènes sur l'os, mais ont une action opposée sur le sein et l'utérus. Ainsi ils luttent contre l'ostéoporose, sans augmenter le risque de cancer du sein et de l'utérus (122).	Acétate de bazédoxifène / oestrogènes conjugués (Duavive)	Pour le traitement des symptômes vasomoteurs associés à la ménopause et à l'ostéoporose post-ménopausique.
		Raloxifène (Evista)	Pour le traitement et la prévention de l'ostéoporose et pour la réduction du risque du cancer de sein chez les femmes post-ménopausées.
Hormonothérapie substitutive (HTS)	C'est une combinaison de l'œstrogène avec de la progestérone, qui comble les baisses de production de ces hormones pendant la ménopause.	Estradiol (Estrace)	Pour la prévention de l'ostéoporose post-ménopausique.
Parathormone	Stimule le remodelage osseux par son action directe sur les ostéoblastes (123).	Tériparatide (Forteo)	Pour le traitement de l'ostéoporose chez les femmes post-ménopausées et les hommes qui sont à risque élevé de fractures.
Anti-RANKL	Intercepte le RANKL et ainsi réduit la stimulation des ostéoclastes (124).	Dénosumab (Prolia)	Pour le traitement de l'ostéoporose chez les femmes post-ménopausées et qui sont à risque élevé de fractures.

1.12.1 Nouvelles cibles thérapeutiques de l'ostéoporose

Actuellement, la parathormone humaine recombinante (rhPTH) est le seul traitement qui stimule la néoformation osseuse en cas d'ostéoporose sévère (125). Malgré tous les efforts déployés, les limites de ce traitement sur les fractures non vertébrales, le coût élevé, la voie d'administration non commode, l'activation de la résorption osseuse et la perte d'efficacité avec le temps montrent que ce traitement ne répond que partiellement

aux besoins médicaux. Il existe un réel besoin de disposer d'un principe thérapeutique anabolique qui stimule uniquement la formation osseuse et présente un meilleur profil. Les nouvelles connaissances au sujet de la physiopathologie de l'os, fournissent de nouvelles pistes pour le développement de nouveaux médicaments. Les travaux les plus actuels concernent ainsi le développement d'agents thérapeutiques spécifiquement ciblés pour agir sur la voie de signalisation de Wnt/ β -caténine. Des anticorps anti-SOST ou anti-DKK1 font l'objet d'une recherche intensive, encore au stade pré-clinique chez l'animal avec des résultats prometteurs qui montrent une augmentation la formation osseuse et offrent de nouvelles perspectives pour le traitement anabolique de l'ostéoporose (126, 127).

1.12.1.1 Anti-sclérostine

L'inhibition de la sclérostine, un antagoniste de la voie Wnt, par un anticorps, constitue un principe thérapeutique anabolique osseux très prometteur (127). La sclérostine est sécrétée par les ostéocytes, les cémentocytes et les chondrocytes hypertrophiques (128). De récentes études ont montré qu'une inhibition de la sclérostine au moyen d'un anticorps, augmente considérablement le nombre d'ostéoblastes et, de ce fait, la formation osseuse. En effet, l'administration d'anticorps anti-sclérostine chez des rates ovariectomisées ostéopéniques a montré une augmentation dose-dépendante de la formation et de la force mécanique osseuse, sans aucune influence sur la résorption osseuse (129). Des résultats similaires ont été obtenus sur le singe (130). En outre, l'injection d'anti-sclérostine chez des rats âgés provoque une augmentation de la formation osseuse, de la masse osseuse, et de la résistance mécanique des os longs et de la colonne vertébrale lombaire (131). Chez les humains, une étude sur des hommes et des femmes ménopausés montre qu'une seule injection de l'anticorps anti-sclérostine entraîne une augmentation dose-dépendante des marqueurs de formation osseuse, une diminution du marqueur de résorption osseuse C-télopeptide sérique et une augmentation de la densité osseuse (132). Dans une étude destinée à déterminer la dose optimale chez des femmes post-ménopausées, une augmentation très significative de la densité minérale osseuse au niveau de la colonne vertébrale a été détectée sur une période de 12 mois (127). Dans l'ensemble, ces résultats encouragent la poursuite des investigations

cliniques pour l'utilisation de l'inhibiteur de la sclérostine afin de stimuler la formation osseuse pour le traitement de l'ostéoporose. Actuellement, des études cliniques de phase III sont en cours.

1.12.1.2 Anti-Dickkopf

Une autre approche potentielle pour le traitement de l'ostéoporose réside dans l'inhibition de DKK1. Dkk1 est un antagoniste de la voie Wnt, il agit en inhibant l'interaction entre le récepteur Frizzled et LRP5. DKK1 est fortement exprimé dans l'os, mais de manière non sélective. En effet, l'inhibition de DKK1 au moyen d'un anticorps chez des jeunes souris femelles induit une augmentation dose-dépendante de la densité osseuse (133). Une autre étude réalisée sur des souris ostéopéniques ovariectomisées montre que l'administration des anticorps anti-DKK1 induit une augmentation significative des taux sériques de Propeptide N-terminal du procollagène de type I (P1NP) et une nouvelle formation osseuse aux surfaces endocorticales et dans l'os trabéculaire, avec une résolution partielle ou complète de l'ostéopénie aux fémurs et aux vertèbres (126). En outre, des études récentes montrent un effet protecteur de l'anticorps anti-DKK1 sur la perte osseuse médiée par l'inflammation chez des souris surexprimant TNF α . L'anticorps anti-DKK1 agit en neutralisant l'effet négatif de TNF α sur la formation osseuse, en empêchant l'apoptose des ostéocytes et l'activation des ostéoclastes (134). L'administration des anticorps anti-DKK1 chez des souris présentant la polyarthrite rhumatoïde induit une inversion de la tendance destructive de l'os en une tendance de formation osseuse (135). De plus, l'inhibition de DKK1 chez des patients atteints de myélome multiple induit une augmentation du nombre d'ostéoblastes et du volume osseux trabéculaire (136).

1.12.2 Autres approches possibles pour activer la signalisation de la voie Wnt/ β -caténine

1.12.2.1 L'inhibition de GSK3- β

Des travaux chez la rate ovariectomisée ont montré que l'inhibition de GSK3- β augmentait la formation osseuse et la résistance biomécanique des os (137). Une autre étude a montré que l'inhibition du GSK3- β prévenait la perte osseuse induite par les

glucocorticoïdes en augmentant la β -caténine et la différenciation des ostéoblastes (138). En outre, un autre inhibiteur de GSK3- β induit l'augmentation de la masse osseuse, probablement due à l'induction de la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses (139). Toutefois, le manque de spécificité de GSK3- β présente le principal défi au développement d'un agent thérapeutique.

1.12.2.2 Lithium

Le lithium est un inhibiteur non-spécifique de GSK3- β communément utilisé pour le traitement de la maladie bipolaire. Chez les souris l'administration de lithium favorise la formation osseuse et améliore la masse osseuse via l'activation de la voie de signalisation Wnt (140). D'autre part, plusieurs études effectuées chez les humains montre que le lithium induit une augmentation de la densité osseuse (141, 142). D'ailleurs, chez l'humain, le lithium induit la différenciation ostéoblastique des cellules souches mésenchymateuses (143). De plus, plusieurs études on montré que l'administration de lithium réduit le risque de fracture (144-146). Cependant, le potentiel du lithium comme un agent anabolisant osseux reste limitée. Le lithium n'est pas actuellement considéré comme une option thérapeutique pour le traitement de l'ostéoporose.

Sommes toutes, la modulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine apparaît une voie de recherche prometteuse pour augmenter la formation osseuse. L'utilisation éventuelle dans un futur proche de ce type de biothérapie est néanmoins en attente d'une démonstration de leur innocuité chez l'humain.

1.13 Maladies parodontales

L'ostéoporose est une maladie qui peut avoir des répercussions au niveau bucco-dentaire. Elle fragilise les os, et notamment la mandibule et le maxillaire, qui soutient les dents induisant leur chute. Plusieurs études ont montré une corrélation positive entre l'ostéoporose et des signes de la maladie parodontale tels que la perte de la densité osseuse des mandibules, la perte de l'attachement parodontale, la perte de la hauteur de la crête alvéolaire et la chute des dents (discuté dans la section 1.14). D'ailleurs ces deux pathologies présentent plusieurs facteurs de risques communs (discuté dans la section 1.15) et des traitements de l'ostéoporose ont montré un effet positif sur la maladie parodontale (discuté dans la section 1.16). Nous aborderons dans la partie qui suit, les généralités sur les maladies parodontales, puis, nous nous intéresserons aux différentes études concernant l'association entre les deux maladies dans la discussion.

1.13.1 Définition de la maladie parodontale

Les maladies parodontales appartiennent à un groupe de maladies inflammatoires qui affectent le parodonte et sont divisées en deux groupes; la gingivite et la parodontite. La parodontite commence sous forme de gingivite, une inflammation de la gencive et peut évoluer en une parodontite, une inflammation du parodonte, incluant la gencive, le cément, le ligament alvéolo-dentaire et l'os alvéolaire (147). Les maladies parodontales sont définies comme étant des maladies infectieuses multifactorielles. La parodontite se caractérise par une inflammation, des saignements gingivaux, une perte d'attache de la gencive et une destruction osseuse qui créent l'apparition d'une poche parodontale constituant une niche bactérienne et qui, à mesure qu'elle progresse, peut induire une mobilité de la dent et une perte de celle-ci (148).

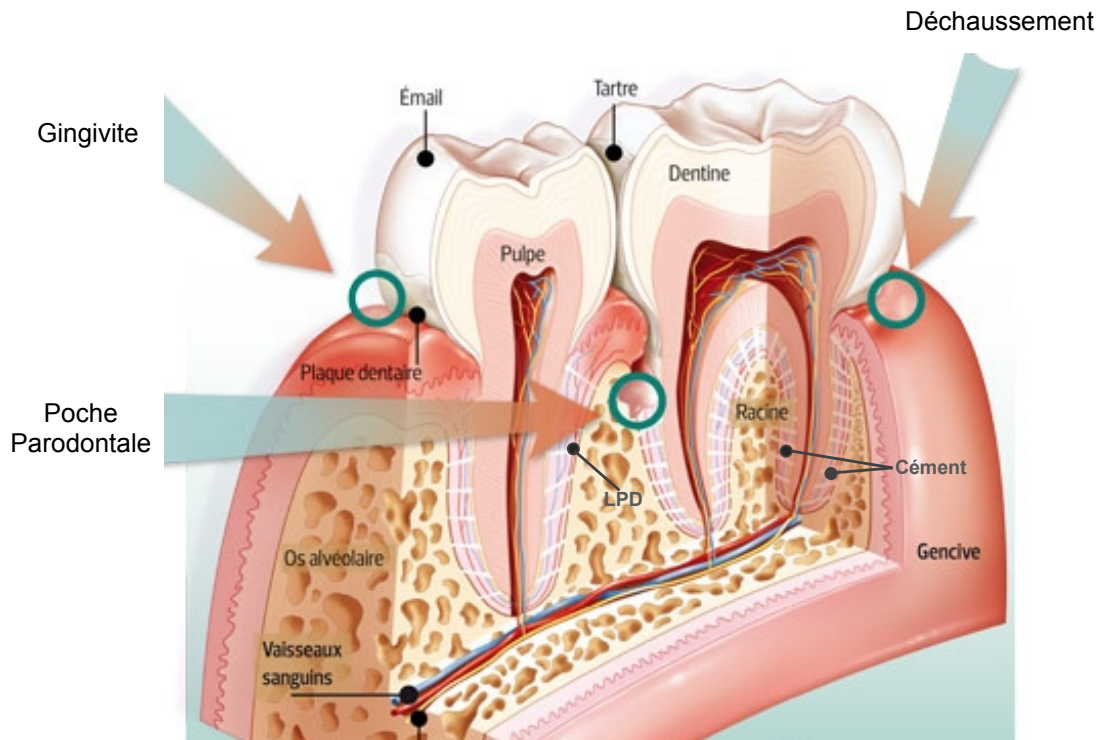


Figure 3: Parodontie dentaire.

Schéma adapté de <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2012/01/19/17137-inflammation-gencives-comment-reagir>.

1.13.2 Prévalence

Environ 5 % à 20 % de la population nord-américaine souffre d'une forme sévère et généralisée de parodontite. La prévalence de la maladie varie selon le sexe, la race, la région géographique et le statut socioéconomique (149). Environ la moitié de la population québécoise âgée de 35 à 44 ans souffre d'une parodontite et un adulte sur cinq souffrira un jour d'une parodontie sévère pouvant impliquer la perte des dents.

1.13.3 Classification des parodonties

En 1999, "l'International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions", a proposé une classification des maladies parodontales en plusieurs catégories; la parodontite chronique, la parodontite agressive, la parodontite secondaire aux désordres systémiques, la parodontite nécrotique, les abcès parodontaux, les lésions endo-parodontales et les difformités congénitales ou acquises (21, 150).

1.13.4 Les parodontites et les maladies systémiques

Les maladies parodontales peuvent être une manifestation d'autres maladies systémiques tel que l'ostéoporose, les déficits hormonaux en estrogènes et l'arthrose ou des maladies d'ordre hématologique tel que la leucémie, la neutropénie acquise ou d'ordre génétique tel que le syndrome de Down, la neutropénie cyclique et familiale (151).

1.13.5 L'évaluation parodontale clinique

Les signes cliniques de dégradation tissulaire tel que l'inflammation, l'évaluation radiographique de la perte osseuse et de la mesure de la perte d'attache clinique au sondage, l'altération de la morphologie gingivale, la récession gingivale, les éventuelles lésions interradiculaires, la migration dentaire ou la mobilité dentaire sont évaluées lors d'un examen parodontal.

1.13.5.1 L'inflammation

La présence d'une inflammation qui se manifeste par la rougeur, l'oedème, la chaleur, la douleur indique que le tissu parodontal n'est pas sain. Le saignement au sondage est largement considéré comme un indice de la présence d'une inflammation (152).

1.13.5.2 La perte du niveau osseux

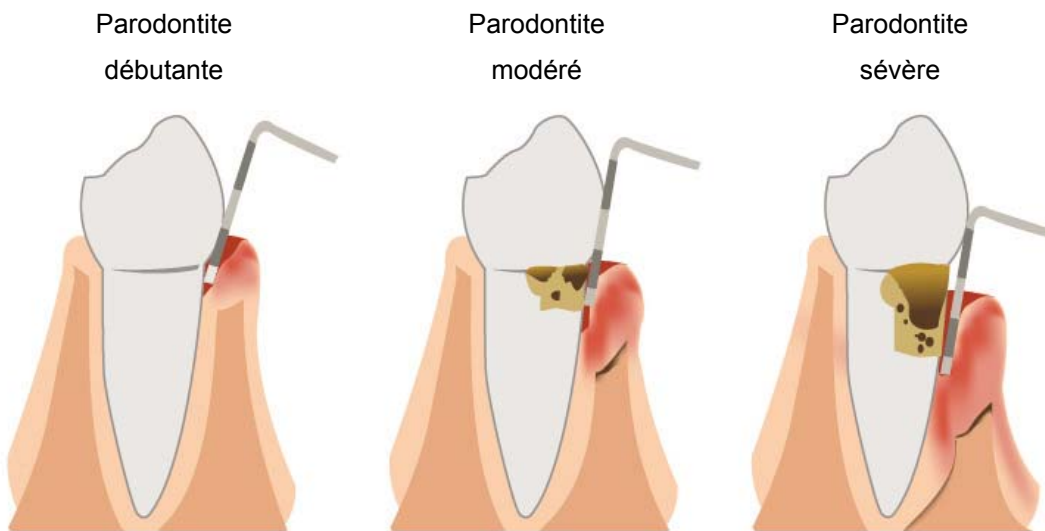
La perte du niveau osseux est évaluée par une analyse des radiographies. C'est la conséquence d'antécédents de parodontites. La destruction parodontale se fait d'une manière intermittente comportant des périodes pendant lesquelles la maladie est active et d'autres où elle est inactive. Pendant la période active, la poche parodontale s'approfondit indiquant une destruction du collagène et de l'os alvéolaire (153).

1.13.5.3 La profondeur de sondage et la perte du niveau d'attache clinique

L'augmentation de la perte d'attache clinique et de la profondeur de la poche parodontale sont des signes pathognomoniques de la parodontite. La profondeur de

sondage représente la distance entre la gencive marginale et le fond de la poche parodontale, c'est une mesure qui représente une approximation clinique de la profondeur de la poche qui traduit l'étendue de l'inflammation tissulaire. D'autre part, la perte du niveau d'attache clinique est définie comme la distance entre la jonction amélo-cémentaire et le fond de la poche parodontale, c'est une mesure très importante car elle représente une approximation clinique de la perte de l'attache du tissu épithéliale à la surface de la racine. Une sonde parodontale calibrée est utilisée pour mesurer ces paramètres. L'évaluation de la sévérité de la parodontite se fait en mesurant les poches à six endroits différents autour de chaque dent selon les critères suivantes (154).

- Normale : pour une poche parodontale de 1 à 2 mm;
- Parodontite débutante : pour une poche parodontale de 3 à 4 mm;
- Parodontite modérée : pour une poche parodontale de 5 à 6 mm;
- Parodontite sévère : pour une poche parodontale de 7 mm et plus;



1

Schéma adapté de <http://www.pdconline.com/genetic-link-to-periodontitis-confirmed/>

1.13.5.4 L'altération de la morphologie gingivale

Elle peut prendre la forme de cratérisation, induite par la plaque bactérienne, ou de décapitation de la papille interdentaire ou d'hyperplasie fibreuse de la gencive marginale, souvent causée par une inflammation gingivale ancienne.

1.13.5.5 Atteintes interradiculaires

L'examen des zones interradiculaires des dents pluriradiculées se fait à l'aide d'une radiographie rétroalvéolaire avec un angulateur accompagné d'un examen clinique à l'aide de la sonde de Nabers. Plusieurs classifications ont été détaillées afin de déterminer le degré de sévérité de la perte d'attache horizontale mais celle de Hamp demeure la plus populaires (155) :

- Classe I : Les lésions présentant moins de 3 mm de perte d'attache horizontale.
- Classe II : Les lésions non transfixiantes présentant de plus de 3 mm de perte d'attache horizontale, dites en cul-de-sac.
- Classe III : Les lésions non transfixiantes, la sonde traverse de part en part, destruction de part en part.

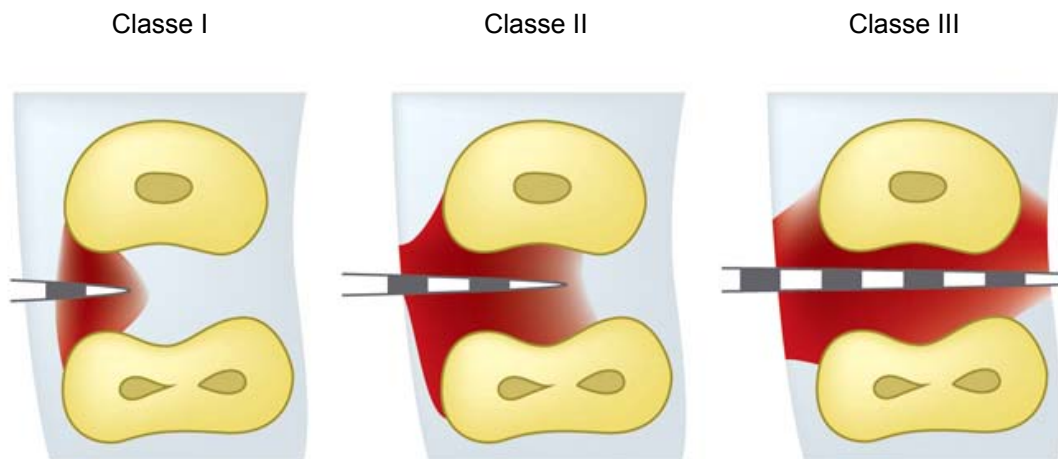


Schéma adapté de <http://www.editionsdcp.fr/revues/jpio/sommaire-du-dernier-numero/n-03/les-atteintes-de-furcations-quelles-strategies-pour-queles-resultats-furcation-invasions-which-strategies-for-which-results.html>.

1.13.5.6 La migration des dents

Elle est le résultat d'une perte sévère du support parodontal, elle traduit les étapes finales d'une parodontite. La migration dentaire pathologique peut résulter des forces occlusales exercées sur les dents qui dépassent la capacité de résistance des tissus de soutien. La migration dentaire est souvent considérée par les patients comme le premier signe d'un problème et constituent le principal motif de consultation.

1.13.5.7 La mobilité dentaire

La mobilité dentaire causé par la détérioration du support parodontal est déterminée en utilisant l'échelle suivante (156) :

- Classe I: mobilité légère transversale de 0.2 à 1mm
- Classe II: mobilité modérée transversale supérieure à 1mm
- Classe III: mobilité marquée transversale et axiale

1.14 Ostéoporose et maladies parodontales

La perte osseuse systémique a été pour longtemps suspectée comme facteur de risque de la perte de l'os alvéolaire et des dents. L'hypothèse émise était alors que l'ostéoporose pouvait entraîner une réduction de la densité osseuse alvéolaire qui devient ainsi plus susceptible à la résorption sous l'effet de l'inflammation et de l'infection parodontale, avec donc un risque plus élevé de perte dentaire. Cette hypothèse a été confirmée par plusieurs études citées dans les tableaux ci-dessous:

1.14.1 Ostéoporose et la perte de la densité osseuse des mandibules

L'ostéoporose fragilise les os, et notamment les os maxillaires, qui soutiennent les dents. Plusieurs études présentées dans le tableau ci dessous ont montré une relation positive entre la densité minérale systémique et orale.

Tableau 3: Relation entre la densité osseuse systémique et orale

Population ciblée	Résultats	Type d'étude	Référence
158 femmes post-ménopausé Âge=62,2 ans +/- 7,6	Corrélation significative entre la DMO de la hanche et la DMO de l'os basale de la mandibule	Étude transversale	Jeffcoat et al. (157)
41 femmes de race blanche les âgées entre 20 et 78 ans	Corrélation positive entre la densité de l'os alvéolaire du maxillaire et celle du rachis lombaire, de la hanche, et du radius chez des femmes en bonne santé. La densité des os alvéolaire des maxillaires diminue avec l'âge	Étude transversale	Southard et al. (158)
28 femmes en santé âgées entre 23 et 78 ans	Forte corrélation entre la perte d'os alvéolaire, la chute des dents et la faible densité osseuse du second métacarpien chez les femmes ménopausées	Étude transversale	Streckfus et al. (159).
69 femmes recevant un traitement hormonal et âgé entre 32 et 64 ans	Correlation positive entre la densité osseuse de la colonne vertébrale et de la mandibule	Étude longitudinale	Jacobs et al. (160)
12 femmes avec des fractures ostéoporotiques et 14 femmes en bonne santé	La densité des minéraux été considérablement réduite dans les mandibules des femmes ostéoporotiques comparée aux contrôles	Étude transversale	Von Wowerm et al. (161)
50 femmes en santé âgées entre 20 et 90 ans	Une corrélation positive entre la masse osseuse mandibulaire et la masse osseuse de la colonne vertébrale et du poignet	Étude transversale	Kribbs et al. (162).
85 femmes ostéoporotiques	Une corrélation positive entre la masse osseuse des mandibules et celle du rachis et du radius	Étude transversale	Kribbs et al. (163)
30 femmes post-ménopausées	Une association entre le taux de calcium total et la densité osseuse des mandibules	Étude transversale	Kribbs et al. (164).
85 femmes ostéoporotiques et 27 femmes en santé âgées entre 50 et 85 ans	Une corrélation positive entre l'ostéoporose et la faible densité osseuse des mandibules.	Étude transversale	Kribbs 1990 (165)
17 femmes ostéoporotiques et 41 femmes en santé	L'ostéopénie, l'ostéoporose des facteurs de risque pour la perte osseuse de la densité alvéolaire chez les femmes post-ménopausées avec une histoire de parodontie	Étude clinique longitudinale, prospective sur 2 ans	Payne (166)

1.14.2 Ostéoporose et la perte de la hauteur de la crête alvéolaire

En présence d'ostéoporose ou de maladies parodontales avancées, on retrouve le même processus physiopathologique, c'est-à-dire un déséquilibre de la balance formation/dégradation osseuse. Plusieurs études présentées dans le tableau ci dessous ont montré une relation positive entre la densité minérale systémique et la perte de la hauteur de la crête alvéolaire.

Tableau 4: Relation entre l'ostéoporose et la hauteur de la crête alvéolaire.

Population ciblée	Résultats	Type d'étude	Référence
44 personnes âgées avec des dents manquantes, 16 hommes et 28 femmes	Une corrélation positive entre l'ostéoporose et la réduction la hauteur de la crête alvéolaire chez des sujets édentés.	Étude transversale	Hirai et al.1993 (167)
59 femmes post-ménopausées (21 fumentes et 38 non-fumentes)	L'ostéoporose, l'ostéopénie et le tabagisme influencent négativement la hauteur de l'os alvéolaire	Étude clinique longitudinale sur 2 ans	Payne et al. 2000 (168)
70 femmes de race blanche, post-ménopausée, âgées entre 51 et 78 ans	Une corrélation positive entre la densité osseuse et la hauteur de l'os alvéolaire	Étude transversale	Tezal et al. 2000 (169)

1.14.3 Ostéoporose et la perte de l'attachement parodontale

Les patients présentant une faible densité osseuse générale semblent être exposés à un risque plus élevé de progression de la maladie parodontale. Plusieurs études présentées dans le tableau ci-dessous ont montré une relation positive entre l'ostéoporose et l'attachement parodontale.

Tableau 5: Relation entre l'ostéoporose et l'attachement parodontale.

Population ciblée	Résultats	Type d'étude	Référence
38 patients ostéoporotiques, âgés entre 43 et 73 ans	Corrélation positive entre le phénotype ostéoporotique et une periodontite sévère	Étude sans contrôle	Groen et al.1968 (170)
20 patients présentant une faible densité osseuse et 22 présentant une densité osseuse élevée	Association entre l'ostéoporose systémique et la perte d'attache parodontale sous forme de récession gingivale	Étude transversale	Mohammad et al.1996 (171)
44 patients divisés en deux catégories selon leur densité osseuse	La perte d'attache parodontale été plus élevé chez les patients à faible densité osseuse	Étude transversale	Mohammad et al.1996 (172)
12 femmes avec des fractures ostéoporotiques et 14 femmes en bonne santé	Corrélation positive entre le phénotype ostéoporotiques et la perte d'attache parodontale	Étude transversale	Von Wowerm et al. (161)
12 femmes avec des fractures ostéoporotiques et 14 femmes en bonne santé	Perte d'attachement parodontale chez les femmes ostéoporotiques comparée aux contrôles	Étude transversale	Von Wowerm et al. (161)
59 adultes présentant une parodontie modérée ou sévère et 16 adultes en santé. Tous durant les 5 années précédant la ménopause	L'administration d'estrogène est associée à une réduction de l'inflammation gingivale, et de la perte d'attache parodontale	Étude clinique longitudinale, prospective sur 2 ans	Reinhardt et al. (173)

1.14.4 Ostéoporose et la chute des dents

La résorption osseuse est l'un des signes les plus importants de la parodontite, l'inflammation conduit à la dégradation de l'os alvéolaire qui se traduit souvent par une perte de la dent.

Tableau 6: Relation entre l'ostéoporose et la chute des dents.

Population ciblée	Résultats	Type d'étude	Référence
208 femmes blanches, âgées entre 60 et 69 avec au moins une prothèse complète	Une corrélation positive entre l'ostéoporose et la perte des dents	Étude transversale	Daniell 1983 (174)
64 femmes entre 50 et 70 ans	Une corrélation significative entre la probabilité d'une fracture au niveau thoracique et la perte des dents	Étude transversale	Taguchi et al. 1995 (175)
38 patients ostéoporotiques âgés entre 43 et 73 ans	Corrélation positive entre le phénotype ostéoporotique et la perte des dents	Étude sans contrôle	Groen et al. 1968 (170)
85 femmes ostéoporotiques et 27 femmes en santé âgées entre 50 et 85 ans	Une corrélation positive entre l'ostéoporose et la perte des dents	Étude transversale	Kribbs 1990 (165)
14,375 femmes et hommes	Association entre la fracture de la hanche et la perte des dents	Étude prospective sur 3 ans	Aström et al. 1990 (176)
329 femmes post-ménopausées	Association entre la densité osseuse systémique et la perte des dents	Étude transversale	Krall et al. 1994 (177)
189 femmes blanches post-ménopausées	Une corrélation positive entre la densité osseuse systémique et la perte des dents	Étude prospective sur 7 ans	Krall et al. 1996 (178)
14 sujets en bonne santé parodontales d'âge moyenne de 64 ans +/- 5ans et 12 sujets qui ont perdues des dents d'âge moyenne de 67.1 ans +/- 2.9 ans	Corrélation positive entre la perte des dents et une faible densité osseuse du rachis lombaire.	Étude transversale	Bando et al. 1998 (179)
90 femmes japonaises	Corrélation entre la densité osseuse de la 3 ^{ème} vertèbre lombaire et la perte des dents postérieures	Étude transversale	Taguchi et al. 1999 (180)
293 sujets âgés, 124 édentés et 169 non édenté.	Association entre la perte des dents et les fractures osseuses	Étude transversale	Xie and Ainamo 1999 (181)

1.15 Facteurs de risques communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales

La parodontite est une maladie multifactorielle: plusieurs facteurs interagissent pour déclencher la maladie, en modulant l'interaction micro-organismes/hôte. Il s'agit de facteurs locaux bucco-dentaires, de facteurs systémiques liés à l'hôte et de facteurs externes ou environnementaux. Certaines conditions peuvent être des facteurs prédisposants ou aggravants de la parodontite, tels l'accumulation de la plaque sous-

gingivale, le stress et certains troubles systémiques (p. ex., diabète, ostéoporose, sida) (182, 183). Certains facteurs comme l'âge, les prédispositions génétiques, la carence oestrogénique, l'administration de certains médicaments, ou certains aspects du mode de vie comme le tabagisme ou des déficiences nutritionnelles, pourraient augmenter en même temps le risque d'ostéoporose et de maladie parodontale. Un tableau résumant ces facteurs et leur effet sur la santé buccale est présenté ci dessous :

Tableau 7: Facteurs de risque communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales

Facteurs de risque communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales	Effet sur la santé bucco-dentaire
Âge avancé	La maladie parodontale s'accroît significativement avec l'âge (augmentation significative du nombre atteints, du nombre des poches profondes, de la perte d'attache et de la perte osseuse (184-188).
La prédisposition génétique	De nombreuses études ont suggéré que des facteurs génétiques étaient impliqués dans l'apparition de la parodontie (189-193).
Le tabagisme	Le tabagisme est significativement associé à la parodontie (perte d'attache, profondeur de poche, nombre des poches et niveau osseux) (21, 194, 195). Le risque relatif de parodontite augmente avec la consommation de cigarettes et la durée du tabagisme chez les fumeurs (196).
Changement hormonal tel que la chute d'oestrogènes	La carence oestrogénique induit une augmentation du risque d'ostéopénie généralisée et d'ostéopénie de l'os alvéolaire (197). Une corrélation positive existe entre le niveau d'estrogène et la densité de l'os alvéolaire (198).
Déficiences nutritionnelles tel que la déficience en Calcium et en vitamine D	La déficience en calcium et vitamine D augmente la susceptibilité aux maladies parodontales sévères (199-201).
Certaines maladies	Leucémie : Corrélation positive entre les maladies parodontales et la leucémie (202-204).
	Autisme : Corrélation positive entre les maladies parodontales et l'autisme (205-207).
	La polyarthrite rhumatoïde : Corrélation positive entre les maladies parodontales et la polyarthrite rhumatoïde (208, 209).

1.16 Traitements d'ostéoporose ayant un effet sur les maladies parodontales

L'ostéoporose et les maladies parodontales semblent survenir sans crier gare, ces maladies ne se manifestent pas du jour au lendemain. Ce sont des maladies silencieuses et chroniques qui se développent au fil du temps. Les signes et les symptômes apparaissent tardivement. Par conséquent, l'application des traitements est retardée jusqu'à un stade avancé. Certaines interventions améliorant la densité osseuse générale, améliorent aussi les indicateurs de maladies parodontales (210). Une amélioration des deux conditions par les mêmes traitements montre qu'il existe un lien sous-jacent. Plusieurs classes de traitements cités dans le tableau 8 ci-dessous s'appliquent à cet égard.

En outre, une étude récente réalisée sur des rats montre que l'administration des anticorps anti-SOST induit une augmentation significative de marqueurs de formation osseuse (augmentation du taux sériques de PINP) et restaure l'os alvéolaire suite à une parodontite (211). En outre, une autre étude a discuté du rôle potentiel de l'utilisation d'anticorps anti-DKK1 dans le traitement des parodontites (212).

Tableau 8: Traitements de la densité osseuse générale améliorant aussi les indicateurs de maladie parodontale.

Traitements	Sujets	Effets
Biphosphonates	Femmes âgées entre 55 et 65 ans traités ou non avec l'alendronate	Une grande amélioration de la profondeur du sillon et une diminution de l'hémorragie gingivale avec une augmentation de la hauteur de la crête alvéolaire chez les sujets recevant de l'alendronate (213).
	Rat qui ont subi un soulèvement d'un lambeau muco-périosté qui permet de visualiser le site osseux	Une réduction de la résorption osseuse suite à une application locale du biphosphonate (214).
	16 chiens de 7 à 9 ans atteints de parodontite modérée ou sévère ont été traités ou non avec l'alendronate pendant 6 mois	Une augmentation significative de la masse osseuse accompagné d'une diminution de la perte de l'attachement parodontale et de la mobilité a été observée chez les sujets recevant de l'alendronate (215).
L'hormonothérapie substitutive (HTS)	228 femmes âgées entre 50 et 64 ans traités ou non avec des HTS	Une diminution de l'hémorragie gingivale chez les sujets recevant des HTS (216).
	3921 femmes retraitées traités ou non avec des HTS	Une diminution de la perte des dents chez les sujets recevant des HTS (217).
	488 femmes âgées entre 72 et 95 ans traités ou non avec des HTS	Une diminution de la perte des dents chez les sujets recevant des HTS (218).
	41,171 femmes post-ménopausées	Le risque de chute des dents diminue chez les femmes sous thérapie hormonale (219).
Supplémentation en calcium et en vitamine D	51 sujets sous traitement parodontale, prenant ou non des suppléments	Des suppléments de vitamine D et de calcium améliorent la santé parodontale (220)
	145 sujets en bonnes santé agés de 65 ans et plus	Les suppléments de calcium et de vitamine D prévient la chute des dents chez les sujets agés (221).

1.17 Gènes communs à l'ostéoporose et aux maladies parodontales

Les résultats cités précédemment appuient une relation entre l'ostéoporose et les maladies parodontales. Toutefois, les mécanismes qui sont à la base de cette association sont inconnus. Un aspect majeur de la recherche fondamentale consiste à élucider si les différentes prédispositions génétiques à l'ostéoporose et les maladies parodontales convergent vers une voie unique. En effet, les mécanismes physiopathologiques de ces deux maladies font intervenir des facteurs génétiques communs, tels que des polymorphismes de nombreux gènes communs laissant croire que ces deux pathologies peuvent partager certains mécanismes cellulaires.

Tableau 9: Gènes communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales

Classification biologique	Gènes communs entre l'ostéoporose et les maladies parodontales	Effet sur la santé buccale
Hormones et récepteurs	Le récepteur de la vitamine D (VDR)	Association du polymorphisme génétique VDR avec les maladies parodontales (196, 222).
	Le récepteur de la calcitonine (CTR)	Association du polymorphisme génétique CTR avec une augmentation de 20 fois la susceptibilité aux maladies parodontales (223).
	Le récepteur d'estrogène (ER alpha)	Association du polymorphisme génétique ER alpha avec les maladies parodontales (224-226)
	Le récepteur des glucocorticoïdes (GR)	L'antagoniste des récepteurs glucocorticoïdes réduit la parodontite chez les rats (170, 227).
Cytokines et récepteurs	Interleukine-1 (IL-1)	Association du polymorphisme génétique IL-1 et la susceptibilité à la parodontite sévère chez les adultes (228-231).
	Interleukine-6 (IL-6)	Association du polymorphisme génétique IL-6 et la susceptibilité à la parodontite (232, 233).
	Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF alpha)	Association de certains polymorphismes génétiques TNF α et la susceptibilité à la parodontite (234).
	Lipoprotéine-related receptors 5 and 6 (LRP5/6)	Association de deux polymorphismes génétiques LRP5/6 et la susceptibilité à la parodontite (235).

D'autre part, une étude récente a montré une augmentation significative des niveaux gingivaux de SOST et DKK1 chez des sujets atteints de parodontite chronique, ce qui suggère l'implication de ces deux molécules dans la maladie parodontale. En outre, des niveaux élevés de SOST sériques ont également été détectés indiquant que SOST peut exercer ses fonctions biologiques non seulement au niveau parodontale mais aussi au niveau systémique chez les personnes atteintes d'une parodontite (236).

L'implication des gènes LRP5/6, SOST et DKK1 dans le développement des maladies parodontales suggère un rôle potentiel de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans cette maladie.

1.18 PITX1 : un gène de susceptibilité?

La nature multifactorielle de ces deux maladies engendre beaucoup de controverses quant à leur étiologie et aux mécanismes moléculaires responsables de leur progression. Cette diversité suggère un niveau élevé d'hétérogénéité dans la nature des gènes de susceptibilité pour chacun des deux maladies, comme en témoigne le grand nombre de loci et de gènes candidats identifiés à ce jour dans l'ensemble du génome humain. Toutefois, l'identification d'un gène de susceptibilité commun aux deux maladies ouvrira la porte sur la possibilité de trouver une cible thérapeutique. Cette cible pourra être validée chez ces patients ostéoporotiques développant des problèmes parodontaux et ainsi avoir un grand impact sur le traitement de la maladie ou l'amélioration de la qualité de vie des patients.

Étant donné que *Pitx1* est exprimé lors du développement embryonnaire dans les membres postérieurs, la mandibule et les dents (237, 238), nous avons considéré ce dernier comme un gène de susceptibilité possible dans le développement de l'ostéoporose et des maladies parodontales.

Nous aborderons dans la partie qui suit, les généralités sur le facteur de transcription PITX1, puis, nous discuterons les différents résultats résultant de sa surexpression au niveau osseux et buccodentaire.

1.18.1 PITX1

PITX1 (pituitary homeobox transcription factor 1), est un facteur de transcription à homéodomaine appartenant à une famille composée de trois membres (PITX1, PITX2 et PITX3) (239). Les membres de cette famille ont des propriétés transcriptionnelles similaires mais leur patron d'expression et leurs rôles dans le développement sont différents. Lors de leur liaison au site consensus TAATCC, ces facteurs de transcription peuvent entraîner une activation ou une répression de la transcription en fonction du promoteur sur lequel ils se lient (240, 241). PITX1 n'est pas seulement exprimé dans la glande pituitaire, comme son nom l'indique, mais également dans l'os, le cartilage, les muscles et les fibroblastes. En effet, PITX1 joue un rôle dans l'organogénèse

hypophysaire et est responsable de la spécification de l'identité des membres postérieurs et du développement adéquat des dents et de la mandibule (242-246).

1.18.2 Rôle de PITX1 dans la formation des membres inférieurs, des mandibules et des dents

PITX1 possède un domaine d'expression antérieur, au niveau du mésenchyme de la première arche branchiale et de l'ectoderme oral et un domaine d'expression postérieur, spécifique au mésoderme de la lame latérale et du bourgeon de membre inférieurs (237). Chez les embryons des souris, à E8 l'expression de *Pitx1* dans le domaine antérieur débute au niveau de l'endoderme viscéral antérieur et du stomodeum. À E9, *Pitx1* est exprimé au niveau du mésenchyme de la première arche branchiale et de la région proximale de la mandibule. L'expression de *Pitx1* est ensuite maintenue dans les dérivés de la première arche branchiale et ceux du stomodeum, plus précisément au niveau du cartilage de Meckel et des muscles de la langue, des épithéliums olfactifs, du nasopharynx, du palais, de la langue, des dents, des glandes submandibulaires ainsi qu'au niveau de l'adénohypophyse (237, 238). Dans le domaine postérieur de l'embryon, l'expression de *Pitx1* est détectée dès E6.8, dans le mésoderme postérieur de la lame latérale duquel émergeront les membres inférieurs. *Pitx1* se retrouve également exprimé dans les dérivés du mésoderme de la lame latérale postérieure, soit les muscles de la paroi abdominale, l'estomac, l'intestin, la vessie et le tubercule génital (237).

1.18.3 Phénotype de la perte partielle et totale de fonction de PITX1

L'inactivation de *Pitx1* chez la souris a été réalisée afin de comprendre son rôle dans le développement (244). Les souris homozygotes dépourvues du gène *Pitx1* (PITX1-/-) meurent à la naissance et présentent un phénotype squelettique sévère. En particulier, ces souris présentent une courte mandibule (micrognathia), notamment due à une mauvaise croissance de la région proximale de celle-ci, ainsi qu'une fusion de la première et la deuxième molaire mandibulaire (244, 246). D'autre part, les membres postérieurs de ces souris présentent de sévères perturbations de développement. Ces changements anatomiques correspondent aux traits morphologiques des os des membres antérieurs,

suggérant l'importance de PITX1 dans la spécification des membres postérieurs. Plus particulièrement, les membres postérieurs de ces souris sont anormalement courts et le tibia est réduit en taille et en diamètre, rejoignant ainsi la taille du fibula ce qui rappelle la similitude entre le radius et l'ulna. En outre, ils présentent de sévères perturbations du développement des articulations qui se traduit par une absence de rotule et une réduction des cartilages aux extrémités du fémur et du tibia rappelle l'articulation du coude. La transformation partielle des membres postérieurs en membres antérieurs, confirme le rôle de *Pitx1* dans la détermination de ces derniers (243, 244). Cette hypothèse a été soutenue par des expériences de surexpression de *Pitx1* chez le poulet qui ont aussi démontré un rôle de ce gène dans la détermination de l'identité postérieure des membres. Les membres antérieurs surexprimant *Pitx1* sont transformés morphologiquement en membres postérieurs. De plus, l'articulation ressemble plus à celle du genou et les doigts ressemblent à ceux du pied autant dans la forme que la taille (243). Les souris hétérozygotes PITX1^{+/-} sont quant à elles normales à la naissance mais développent progressivement des changements au niveau de l'os et du cartilage articulaire. Ces changements se manifestent par une augmentation de la masse osseuse de l'os cortical et de l'os trabéculaire, ainsi qu'une augmentation du volume de l'os sous-chondral et l'amincissement et la calcification anormale du cartilage articulaire. Un phénotype apparenté aux stades précoces de l'arthrose (247).

1.18.4 Les partenaires et les cibles de PITX1

Pitx1 active ou réprime les gènes cibles par son interaction avec leur promoteur via des éléments de réponses bLCE, qui appartient à celui de *bicoid*, *bicoid*-like cis-elements, et qui présente généralement la séquence 5'-TAAT/GCC/T-3' (248-250). Sa fonction d'activateur ou de répresseur peut être régulée par son interaction avec divers partenaires (251-258). PITX1 dispose d'un large éventail de cibles transcriptionnelles y compris les gènes codant pour des hormones (POMC, CGA, LHB, FSHB, TSHB, GH1 et PRL), des récepteurs (GNRHR, SSTR2, et EDNRA) et des facteurs de transcription (HOXC10, HOXC11, TBX1, TBX4 et p53). La plupart du temps, PITX1 agit comme un activateur modérée mais il peut agir en synergie avec d'autres cofacteurs pour produire

une activation plus forte. PITX1 peut également moduler les niveaux d'expression de ses propres partenaires de liaison.

1.18.5 La surexpression de PITX1 induit l'apoptose

La surexpression de *Pitx1* peut induire l'apoptose et son rôle de suppresseur de tumeur est consolidé par sa capacité à activer p53 et inhiber RAS et TERT. Des études récentes ont démontré que PITX1 agit comme suppresseur tumoral en inhibant l'activation de l'oncogène RAS via l'activation de la transcription de RASAL1 (259). L'activation de RASAL1 et de PITX1 dans les cellules humaines de carcinome hépatocellulaire, induit une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose, alors que leur inhibition induit une augmentation de la prolifération et une résistance accrue à l'apoptose (196). D'autre part, une étude publiée en 2007 a montré que la surexpression de *Pitx1* dans les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 conduit à l'apoptose démontrant que PITX1 agit comme suppresseur tumoral en stimulant la transcription de p53 (260). Cette notion est soutenue par les résultats qu'une surexpression conditionnelle de *Pitx1* suivie de l'activation des voies dépendantes de p53 induit une atrophie musculaire chez la souris (261). D'autre part, lors d'une exposition à un stress génotoxique, la tyrosine kinase c-Abl induit une surexpression de *Pitx1* dans la réponse apoptotique aux dommages de l'ADN indépendamment de p53 (262). En outre, le rôle de PITX1 en tant que suppresseur de tumeurs a été corroboré par sa capacité à inhiber l'expression de la télomérase transcriptase inverse (TERT), une enzyme essentielle pour le maintien de la longueur des télomères et crucial pour l'immortalisation cellulaire et la progression du cancer (263).

1.18.1 PITX1, et son rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire

Plusieurs études ont montré que PITX1 joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Des niveaux élevés de *Pitx1* induit une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose. Inversement, sa baisse d'expression semble corrélér avec une augmentation de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, de bas niveaux de PITX1 ont été observés dans des cancers d'origines très variées tel que le

cancer du poumon, de l'estomac, du côlon et de la prostate (264-266). D'autre part, L'équipe de Dr Moreau a montré que la perte d'expression de *Pitx1* perturbe la différenciation des chondrocytes articulaires engendrant un phénotype semblable à l'arthrose (247). En outre, le traitement des cellules cancéreuses du poumon H526 avec du 5-bromodésoxyuridine (BrdU), un agent inducteur de la différenciation, conduit non seulement à un changement phénotypique dramatique mais à la surexpression de certains gènes dont *Pitx1* (267). La diminution du niveau d'expression de *Pitx1* dans les cellules d'adénocarcinomes de l'œsophage de Barrett, a été associée au processus de dédifférenciation cellulaire (268).

En résumé, ces études montrent que des changements dans les niveaux d'expression de *Pitx1* pourraient influencer la prolifération et la différenciation cellulaire dans plusieurs pathologies.

1.18.2 Le rôle de PITX1 dans les pathologies musculosquelettiques humaines

L'augmentation ou la perte d'expression de *Pitx1* sont associées à un défaut dans le développement et le maintien des différentes structures musculoquelettiques tels les os, le cartilage articulaire et les muscle. En effet, ces changements surviennent dans des pathologies comme l'ostéoarthrose, la dystrophie facio-scapulo-humérale, le pied bot et la polydactylie.

1.18.2.1 L'ostéoarthrite ou arthrose

L'ostéoarthrite (OA) est une pathologie dégénérative qui se développe sur plusieurs années durant lesquelles il se produit une dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire ainsi qu'un épaissement de l'os sous-jacent. En effet, l'équipe du Dr Moreau a démontré que les souris PITX1+/-, présentent les signes cliniques de l'OA. En effet, PITX1 joue un rôle particulier dans le développement des articulations des membres inférieurs et l'inactivation partielle de PITX1 entraîne progressivement un épaissement anormal de l'os sous-chondral, trabéculaire et cortical des têtes de fémurs accompagné d'une calcification marquée du cartilage (247). Chez l'humain, l'équipe du Dr Moreau a démontré que PITX1 est normalement exprimé au

niveau du cartilage sain chez les sujets témoins non arthrosiques et qu'il y a une perte d'expression chez les patients présentant une ostéoarthrite primaire (247).

1.18.2.2 La dystrophie facio-scapulo-humérale

La dystrophie facio-scapulo-humérale (FSHD) est une maladie génétique rare. Elle touche essentiellement les muscles du visage, des épaules et des bras, et peut progresser pour atteindre les muscles de l'abdomen et des membres inférieurs. La dystrophie FSH se transmet selon un mode autosomique dominant (269). L'activation du gène DUX4 module l'expression du gène *Pitx1*, qui est augmentée dans la FSH. En effet, des biopsies musculaires de patients atteints de FSHD montrent une surexpression de *Pitx1* par rapport à des échantillons de muscle normal ou d'individus atteints d'autres maladies neuromusculaires (270, 271). Une étude récente de l'expression des protéines DUX4 et PITX1 dans des myotubes atteints ou non de FSH suggère l'existence d'un mécanisme d'activation en cascade. D'ailleurs, le gène *Dux4* serait activé dans un petit nombre de noyaux et la protéine DUX4 produite diffuserait jusqu'aux noyaux voisins où elle activerait, entre autres, le gène *Pitx1*. A son tour, la protéine PITX1 diffuserait jusqu'aux noyaux voisins et continuerait d'étendre la cascade d'activation (270). De plus, la protéine PITX1 a un rôle important dans l'atrophie musculaire. En effet, la surexpression conditionnelle de *Pitx1* chez la souris induit une atrophie musculaire (261).

1.18.2.3 Le pied bot

Connue sous le nom de Clubfoot (en anglais), le pied bot est une malformation congénitale impliquant un pied ou les deux. Le pied touché semble avoir été tourné vers l'intérieure. Les personnes avec des pieds bots semblent souvent marcher sur leurs chevilles ou sur les côtés de leurs pieds. Le mode de transmission de cette maladie est expliqué avec un modèle de seuil polygénique et représente un trouble hétérogène. Une récente étude a révélé une substitution de G en A, ce qui entraîne le remplacement de la lysine par l'acide glutamique à la position 130 (E130K) à l'intérieur de l'homéodomaine, constituant le domaine d'interaction de PITX1 avec l'ADN. Cette mutation a été identifiée chez toutes les personnes touchées avec la maladie de pied bot dans une famille de cinq

générations (272). De plus, d'autres malformations des membres inférieurs, y compris l'hypoplasie patellaire, le talus oblique, l'hémimélie tibiales, la dysplasie de la hanche, et la polydactylie préaxiale, étaient également présentes dans certains membres de cette famille (272). Une autre étude a été réalisée sur d'autres patients atteints de pied bot. Cette étude a révélé une association entre une microduplication au niveau 17q23.1q23.2 contenant *Tbx4*, un gène régulé par PITX1, et la maladie de pied bot (273). *Pitx1* et *Tbx4* sont exprimés uniquement dans les membres postérieurs. Le rôle de la voie de transcription *Pitx1-Tbx4* dans l'étiologie du pied bot a encore été soutenu par une autre étude qui a identifié une microdélétion au niveau du chromosome 5q31 dans des membres d'une famille ayant le pied bot, mais pas chez leurs parents non affectés. De plus, le même groupe a montré une corrélation positive entre l'haploinsuffisance de PITX1 et le développement de la maladie pied bot chez les souris (274).

1.18.2.4 La polydactylie

Elle se définit comme la présence d'un ou plusieurs orteils supplémentaire (s) au niveau du pied ou d'un ou plusieurs doigts supplémentaire (s) au niveau de la main. Une étude récente a montré qu'une délétion de PITX1 induit un spectre de malformations au niveau des membres inférieurs, y compris la polydactylie (275). De plus, ce phénotype était présent chez des patients présentant la mutation *Pitx1* (E130K) impliquée dans le développement de la maladie pied bot (272).

Ces études montrent l'implication de PITX1 dans plusieurs malformations musculosquelettiques touchant surtout les membres inférieurs. Par conséquent, le contrôle spatio-temporel de l'expression de *Pitx1* s'avère une étape cruciale dans le développement des membres inférieurs.

Préface au chapitre 2

Ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit qui sera soumis au Journal of Bone and Mineral Research (JBMR) en Decembre 2015.

Dans le cadre du premier article, nous avons montré que PITX1 joue un rôle crucial dans l'homéostasie de l'os *via* l'inhibition de la voie de signalisation Wnt canonique.

Les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* surexprimant *Pitx1* ont été créées par Dr Benoît St-Jacques. Après son départ du laboratoire en 2010, j'ai entrepris la caractérisation phénotypique de ces souris et identifié le mécanisme par lequel ces souris développent une ostéoporose sévère. J'ai réalisé la plupart des expériences de ce projet. Les essais de différenciation ont été réalisés en partie par le Dr Jean-François Lavoie. Anita Franco, assistante de recherche, a réalisé les mesures de RANKL et OPG circulants. Saadallah Bouhanik, assistant de recherche, a effectué les traitements des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* avec le chlorure de lithium. Tandis que, Josée Dépôt et Charlotte Zaouter m'ont aidé dans la réalisation des sections histologiques.

En outre, j'ai écrit le manuscrit, qui a été par la suite revue et corrigé par le Dr Moreau.

Chapitre 2 : Article #1

La surexpression du facteur de transcription PITX1 dans les ostéoblastes conduit à une diminution de la masse osseuse via l'inhibition de la voie de signalisation canonique Wnt

Title page: Overexpression of Transcription Factor PITX1 in Osteoblasts Leads to a Decrease in Bone Mass by Inhibiting the Canonical Wnt Signaling Pathway

Nancy Karam^{1,2} MSc, Jean François Lavoie^{1,2}, PhD, Benoit St-Jacques¹, PhD, Saadallah Bouhanik¹, MSc, Anita Franco¹, MSc, and Alain Moreau^{1,2,3} PhD.

¹Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Centre, Montréal, Qc, Canada; ²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal; ³Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal;

Running title: Overexpression of *Pitx1* induces osteoporosis in *Coll α 1-Pitx1* mice

Corresponding author: Professor Alain Moreau, PhD, CHU Sainte-Justine Research Center, 3175 Cote-Sainte-Catherine Road, Montreal, Qc, H3T 1C5, Canada.

Abstract

Paired-like homeodomain transcription factor 1 (PITX1) has been implicated in the regulation of osteoarthritis and osteoporosis. The present study aims to analyze the role of *Pitx1* in regulating bone mass. We generated a bone-specific *Pitx1*-overexpressing transgenic mouse model (*Collα1-Pitx1*) using the type-I collagen promoter. Dual-energy X-ray absorptiometric (DXA) scanning and microcomputed tomography (μCT) revealed a severe osteoporotic phenotype in transgenic *Collα1-Pitx1* (TG) mice. The three-point bending test indicated reduced bone strength in the femurs of the transgenic mice, and histomorphometric analysis showed reduced number of osteoblasts and osteoids along with a significant reduction in mineralized surface, bone formation rate, and osteoclast number compared with wild type (WT) mice. Overexpressed *Pitx1* in TG osteoblasts or forced expression of *Pitx1* in WT osteoblasts infected with a *Pitx1*-lentivirus, downregulated key osteogenic genes (*Runx2*, *Osx/Sp7*, *Alp1*, *Ocn*, *Spp1*). Conversely, siRNA knockdown of *Pitx1* in TG osteoblasts significantly upregulated the osteogenic genes and rescued the maturation and mineralization of TG osteoblasts. Overexpressed *Pitx1* significantly reduced the total number of colony forming units (CFU) derived from bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) as well as their capacity to differentiate to osteoblasts or adipocytes. Expression analysis also revealed a significant upregulation of Wnt-regulating proteins, *DKK1*, *SOST*, and *Gsk3-β*, in TG osteoblasts with an accumulation of phospho β-catenin at the protein level in the total cell lysates. *Collα1-Pitx1* mice treated with lithium chloride (LiCl), a known GSK3-β inhibitor, were protected from bone loss compared with untreated mice. Our observations demonstrate that *Pitx1* regulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by inactivating the canonical Wnt signaling pathway.

Keywords: PITX1, *Collα1-Pitx1* transgenic mice, osteoblasts, osteoporosis, Wnt/β-catenin

Introduction

The mechanisms underlying bone formation and bone loss are not fully understood. Several evidences suggest a role for the transcription factor PITX1 in regulating bone mass. Comparative gene expression analysis of osteoblasts derived from monozygotic twins discordant for osteoporosis reported an 8.6-fold upregulation of *Pitx1* expression in the osteoporotic twin ⁽¹⁾. PITX1 is a homeobox transcription factor belonging to a family of three members (PITX1, PITX2, and PITX3) ⁽²⁾. During mouse development, *Pitx1* is highly expressed in the perichondrium of hindlimb long bones suggesting its importance in skeletal development including joint angle articulations ⁽³⁻⁵⁾. Interestingly, ageing PITX1+/- heterozygous mice that are normal at birth, progressively develop osteoarthritis-like lesions in cartilage with a drastic increase in cortical and trabecular bone formation ⁽⁶⁾. Since the partial loss of function of PITX1 causes an increase in bone density, it is conceivable that its gain- of-function could have the opposite effect and may cause an osteoporosis-like phenotype. In order to address the role of *Pitx1* in regulating bone mass, transgenic mice were engineered to overexpress *Pitx1* in pre-osteoblasts and mature osteoblasts using the 2.1 kb fragment of the mouse *Colla1* gene promoter. In this study, we characterize the bone phenotype of adult *Colla1-Pitx1* mice and investigate the effect of overexpressed *Pitx1* on osteogenic genes. Our findings provide evidence that *Colla1-Pitx1* transgenic mice exhibit an osteoporotic-like phenotype. Impaired bone anabolism is partially a result of the inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Materials and Methods

Generation of *Collα1-Pitx1* mice

Transgenic mice overexpressing *Pitx1* (*Collα1-Pitx1*) in pre-osteoblasts and osteoblasts were generated using 2.3 kb fragment of the promoter for the *Collα1* protein ⁽⁷⁾, to control the expression of the coding sequence of *Pitx1* (*Pitx* murine cDNA), which was subcloned in a pCI plasmid. A synthetic intron was subcloned between the promoter and the coding sequence, and a polyadenylation cassette was subcloned downstream of the coding sequence in the same vector. The expression vector pCI-*Collα1-Pitx1* was injected into C57BL/6J oocytes (IRIC's transgenesis platform, Université de Montréal). The founders were screened for *Pitx1* overexpression by PCR using mouse tail genomic DNA. Transgene (TG) expression in the tissues was assessed by RT-PCR using two sets of transgene-specific primers *Pitx1* (F: 5'-ACTGGGCTTGTCGAGACAGAG-3'; R: 5'-CAGATCAGCGTCGGACGATTC-3'). Three TG founders were identified. The transgene lines were generated by mating founder animals with C57BL/6J mice. All the mice experiments were performed according to the protocols approved by the Animal Ethics Committee of the CHU Sainte-Justine University Hospital Research Center.

Radiologic imaging and dual beam X-ray absorptiometry

Ten TG mice (females = 5; males = 5) and ten WT mice (females = 5; males = 5) of 12-week-old were analyzed by high resolution X-rays using Faxitron MX20 (Faxitron Corp, IL, USA), and the bone mineral density (BMD) was measured by dual-

energy X- ray absorptiometry (DXA; PIXIMus II densitometer; GE Healthcare, WI, USA) at 3, 5, and 7 months of age under anesthesia.

Microcomputed tomography analysis

The femoral bones of ten TG mice (females = 5; males = 5) and ten WT mice (females = 5; males = 5) of 12-week-old were harvested and stored in 70% ethanol at 4°C. The middle cortical and the trabecular bones of the distal metaphysis were scanned by microcomputed tomography (μ CT) using a SkyScan-1072 desktop MicroCT scanner (Bruker microCT, Kontich, Belgium). The femoral bone samples were scanned by an X-Ray source power at 45 kV/222 μ A and with 6.25 μ m/pixel resolution. The rotation was set at 0.9 degrees per step for 180 degrees and the exposure time was set at 2.8 seconds for each step. The cross sections along the specimen axis were reconstructed using NRecon (v 1.6.1.3, SkyScan). A CT-Analyser (v 1.10.0.1, SkyScan) was employed to perform quantitative analyses and create 3D models. 3D Creator (v 2.4, SkyScan) was used to manipulate the 3D models and create 3D images.

Bone material and biomechanical properties

Freshly dissected femurs of ten TG mice (females = 5; males = 5) and ten WT mice (females = 5; males = 5) of 12-week-old were tested for their biomechanical strength using a three-point bending test performed on a Mach-1TM micro-mechanical testing system (Biosyntech Inc., Quebec, Canada). Extrinsic parameters, such as ultimate force (N), stiffness (N/mm), and work to ultimate point (N*mm) were obtained from a force displacement curve. The displacement resolution was 0.1 μ m,

the travel range was 25 mm, the ramp velocity was 50 $\mu\text{m/s}$, the load cell resolution was 0.5 g for ± 10 kg, and the fixed relaxation time was 60 s.

Preparation of primary osteoblasts and mesenchymal stem cells

Osteoblasts and mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from three TG mice and three WT mice of 12-week-old. The femurs were dissected and thoroughly cleared of muscle and connective tissue, after which the outer surfaces of the bone were scraped to remove the periosteal surface. The bone marrow was flushed with 5 ml media. Large fragments were removed by filtration using a 70 μm nylon mesh cell strainer. The cells were pelleted by centrifugation and resuspended in 2 ml media. The cells were plated at a density of 2×10^5 cells/ cm^2 in 6-well microplates with Alpha Modification Eagle's Medium 1x (AMEM) (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) containing 20% fetal bovine growth serum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, UT, USA) and 1% Antibiotic-Antimycotic solution (Thermo Fisher Scientific Inc., NY, USA). The bones were cut using a sterile stainless steel surgical blade into small pieces of 1-3 mm^3 . The bone pieces were washed in serum-free media three times and then serially digested by incubating in 1 mg/ml type-I collagenase twice for 20 min, followed by 2 hours of further incubation (Sigma-Aldrich Canada Co.) at 37°C. The digested bones were washed three times in serum-free medium, with vigorous hand shaking and then cultured in AMEM with 20% FBS and 1% antibiotic-antimycotic solution.

Alkaline phosphatase and alizarin red staining of osteoblast cultures

For alkaline phosphatase (ALP) staining, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes and stained with ALP detection solution (Sigma-Aldrich Canada Co.) for 30 minutes at 37°C. The mineralized osteoblast cultures were fixed in 70% ethanol for 1 hour at 4°C. The cells were then stained with 0.2% Alizarin red in 2% ethanol for 15 minutes. After being washed five times with water, the cells were dried at 37°C. Mesenchymal stem cells (MSCs) were stained with hematoxylin for colony quantitation.

Isolation of RNA and protein from bone tissues, real-time PCR, and Western blotting

The long bone tissues of three TG mice and three WT mice of 12-week-old were isolated from all the soft tissues, and the bone marrow was removed by flushing with PBS. The bone samples were then pulverized using liquid nitrogen and a frozen mortar and pestle. Total RNA was extracted using TRIZOL reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.), and cDNA were prepared using the ThermoScript™ RT-PCR kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Real-time PCR was performed in a Mx3000P PCR (Stratagene Corp, CA, USA) using the QuantiTect® SYBR® Green PCR kit (Qiagen Inc., ON, Canada) to detect the mRNA expression of *Pitx1*, *Runx2*, *Osx/Sp7*, *Alp1*, *Ocn*, *Spp1*, *Ppargamma-1*, *Cebp*, *Adipoq*, *Ap2*, *DKK1*, *SOST*, and *GSK3-β*. The specific DNA primers used are shown in Table 1. All real-time PCR experiments were performed in triplicate, and β-actin was used as a housekeeping gene control. The ΔΔCT method was used for qPCR data analysis. Total protein lysates were obtained from cultured

osteoblasts of *Colla1-Pitx1* transgenic and wild type mice. Western blotting was performed to detect the expression of β -catenin and phospho- β -catenin in the bone lysate by probing with rabbit anti- β -catenin antibody (ab6302) (1:4000 dilution), or rabbit anti-phospho- β -catenin (ab27798) (1:500 dilution), or mouse anti-GAPDH (sc-20357) (1:5000), followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit (eBioscience,18-8816-33) or anti-mouse (eBioscience,18-8817-33) secondary antibody (1:5000), respectively.

Knockdown and overexpression of *Pitx1*

Knockdown of *Pitx1* expression was performed in primary *Colla1-Pitx1* osteoblasts transfected with a scrambled sequence or *Pitx1* siRNA oligonucleotide (5'-AAACGACGAGUGCUGUUUGGACUUG-3') (Thermo Fisher Scientific Inc.) using Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific Inc.). Forced expression of *Pitx1* was performed using lenti-XTM Lentivirus Expression Systems (Clontech Laboratories, Inc., CA, USA) by infecting primary wild type (WT) mouse osteoblasts.

Quantitation of plasma biomarkers

The levels of *RANKL*, *OPG*, *DKK1* and *SOST* in plasma were measured using ELISA kits for RANKL and OPG (Abcam®, Toronto, Canada) as well as DKK1 and SOST (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

Lithium treatment

A group of 12 TG males and 12 TG females received only 0.01 M NaCl (control group), and the second group of 12 TG males, and 12 TG females received 0.01 M LiCl (Sigma catalog no. L9650) diluted in water, for 2 months.

Statistical analysis

The data were evaluated statistically using Student's *t* test in SPSS Windows, version 10.0. Results are shown as mean \pm standard deviation (SD). The *p* values were considered significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

Results

Generation of *Colla1-Pitx1* transgenic mice

All the transgenic (TG) *Colla1-Pitx1* mice were smaller in size than their wild type (WT) littermates (Fig. 1A, 1B). The body weights of the TG mice (females = 5; males = 5) were respectively, 28.7% ($p = 0.006$) and 39.5% ($p = 0.001$) smaller than the WT mice (females = 5; males = 5) at 28 weeks (Figs 1C, 1F).

Overexpression of *Pitx1* decreases bone mass

Radiological analysis and bone mineral density (BMD) measurements assessed the difference in bone mass between adult WT and TG mice. The BMD of whole femurs of TG (females = 5; males = 5) mice aged 12-week-old was reduced by 15.9% in females ($p = 0.014$), and 13.4% in males ($p = 0.023$) when compared with WT

(females = 5; males = 5) mice (Figs 1D, 1G). Similarly, the bone mineral content (BMC) was reduced by 13.3% in females ($p = 0.05$), and 23.3% in males ($p = 0.05$) compared with WT mice (Figs 1E, 1H). The decrease in bone mass was observed in females throughout the 28-week observation period. In TG males, the bone mass decreased in the first 20 weeks of observation and then became similar to that of WT mice. These observations indicate that *Pitx1* overexpression in osteoblasts decreases bone mass in mice.

***Pitx1* overexpression impairs bone microarchitecture and biomechanical strength**

We used microcomputed tomography (μ CT) to analyze the structural parameters of the trabecular and cortical bones of femurs harvested from 12-week-old WT (females = 5; males = 5) and TG (females = 5; males = 5) mice. Three-dimensional images showed alterations in the trabecular bones of the TG mice when compared with those of the WT mice (Figs. 2A-2D). Quantitation of the structural parameters revealed that the trabecular bone surface over bone volume (Tb.BS/BV) and the trabecular pattern factor (TB.Pf) were significantly increased by 23.1% and 10.4%, respectively, in TG females ($p < 0.01$), and by 31.4% and 55.4%, respectively, in TG males ($p < 0.01$) (Figs. 2E, 2F). Conversely, the trabecular thickness (Tb.Th) and the structure model index (SMI) were decreased by 22.8% and 11.5%, respectively, in TG females ($p < 0.01$) and by 19% and 16.7% ($p < 0.01$), respectively, in TG males (Figs. 2G, 2H). Quantitation of the structural parameters in cortical bones revealed that the cortical bone volume density (Ct.BV/TV) and the cortical thickness (Ct.Th) were decreased by 7.2% and 55.6%, respectively, in TG females ($p < 0.01$) and by 6.5% and 62.5%,

respectively, in TG males ($p < 0.01$) (Figs. 3C, 3D). Conversely, the cortical bone surface over bone volume (Ct.BS/BV) and the cortical porosity (Ct.porosity) parameters were significantly increased by 54% and 81.6%, respectively, in TG females ($p < 0.01$) and by 64.4% and 87%, respectively, in TG males ($p < 0.01$) (Figs. 3E, 3F).

The biomechanical strength of the freshly dissected femurs was evaluated by a three-point bending test. The bone strength was decreased by 45.8% in TG females ($p = 0.03$) and 33.8% in TG males ($p = 0.025$) when compared with WT mice (Fig. 3G). The ultimate force was significantly decreased in TG femurs (10.6 ± 0.3 N, $p < 0.005$ in TG females; 16.5 ± 4 N, $p < 0.05$ in TG males) compared with WT (16.7 ± 1.4 N in WT females; 23.7 ± 2 N in WT males) (Fig. 3H). The work to ultimate point was significantly decreased by 53.8% in TG females ($p = 0.05$) and 58.3% in TG males ($p = 0.0007$) when compared with WT mice (Fig. 3I). Our data revealed that adult TG mice overexpressing *Pitx1* in bone tissues had reduced bone mass density, compromised microarchitecture, and reduced biomechanical bone strength compared with WT mice.

Changes in bone formation in TG *Colla1-Pitx1* mice

To determine whether the reduced bone mass in TG *Colla1-Pitx1* mice was due to decreased bone formation, we performed static and dynamic bone histomorphometry analysis on sections of undecalcified femurs of WT and TG mice at 3 months. Goldner's trichrome and toluidine blue staining revealed reduced number of osteoids in the cortical bones of TG mice (Figs. 4A-4D). There was a significant decrease of 64.2% in TG females ($p = 0.003$) and 85% in TG males ($p = 0.007$) in the

trabecular perimeters occupied by osteoids presented as the ratio of the osteoid surface to bone surface (OS/BS) (Fig. 4E). In addition, there was a significant decrease in the osteoid volume over bone volume (OV/BV) of 67.9% in TG females ($p = 0.012$) and 67.3% in TG males ($p = 0.054$) (Fig. 4F). Among bone formation parameters, the number of osteoblasts lining the trabecular bone (N.Ob/B.Pm) and the percentage of bone surface occupied by osteoblasts (Ob.S/BS) were significantly decreased by 64.4% in TG females ($p = 0.003$) and 77.3% in TG males ($p = 0.007$) compared with WT controls (Fig. 4G). We also observed a significant reduction in the mineralized surface, bone formation rate and mineral appositional rate in TG mice (Supplementary Figure 1). Taken together, these results suggest that a mineralization defect causes low bone mass density and altered microarchitecture in TG mice leading to the formation of immature woven-type bones.

Overexpression of *Pitx1* affects osteoblast differentiation and mineralization

Alkaline phosphatase is a marker for stem cells and the fluorescent dye alizarin red is used to detect mineralized nodules in osteoblasts. To investigate changes in osteoblast differentiation, we compared the formation of alkaline phosphatase (ALP)-positive colonies and the number of mineralized nodules (Alizarin red staining) in primary osteoblast cultures derived from WT and TG mice. The results showed a reduction in the number of ALP-positive cells and mineralized nodules over a 14-day culture in TG cells compared with WT cells (Figs. 5A, 5B). We then examined the expression of genes related to osteoblast differentiation. The expression level of differentiation markers *Runx2*, *Osx*, *Alp* and *Ocn* were significantly decreased in TG cells compared with

WT ones (Fig. 5C). Conversely, reduced *Pitx1* expression levels in *Colla1-Pitx1* osteoblasts transfected with *Pitx1*-siRNA, was sufficient to rescue TG osteoblast differentiation and mineralization as well as osteoblast differentiation marker expression (Fig. 5D, 5E). Of note, forced *Pitx1* expression in WT osteoblasts infected with a lentivirus expressing *Pitx1* led to a 4.1-fold increase in *Pitx1* expression when compared with normal endogenous *Pitx1* expression and reproduced the effects observed in TG osteoblasts (Figs. 5F, 5G). These results show that *Pitx1* overexpression induces a cell-autonomous mineralization defect.

We performed colony-forming unit fibroblast (CFU-F) assays to analyze the effect of *Pitx1* on the number of mesenchymal progenitors. The results revealed that the CFU number of TG mesenchymal stem cells (MSCs) decreased by 48.8% ($p = 0.012$) compared with WT MSCs after being cultured for 11 days, which indicated that TG mice had fewer mesenchymal progenitors (Figs. 6A, 6B). Since our data suggest that *Pitx1* negatively regulates early stage osteoblast differentiation, we investigated whether *Pitx1* upregulation in TG mice could affect osteoprogenitors. Cultured TG MSCs in osteogenic differentiation media exhibited a significant 31.4% ($p = 0.0006$) reduction in the number of osteogenic ALP+ (CFU-ALP+) colonies, few mineralized nodules, and a downregulation of osteogenic markers compared with WT MSCs in the same conditions (Figs. 6C-6E). Conversely, siRNA reduction of *Pitx1* expression levels in TG MSCs decreased *Pitx1* expression by 3.2 fold when compared with untransfected TG cells (NT) or those transfected with scrambled siRNA (Neg). Reduced expression levels of *Pitx1* in TG MSCs increased their capacity to differentiate to mature osteoblasts and increased the mRNA expression level of osteogenic markers *Runx2*,

Osx, *Alp* and *Spp1* (Fig. 6F, 6G). Of note, forced *Pitx1* expression in lentivirus-infected WT MSCs, increased *Pitx1* expression by 2.4-fold compared with uninfected cells and reproduced the effects observed in TG MSCs (Figs. 6H, 6I).

Overexpression of *Pitx1* in osteoblasts inhibits osteoclast formation

Osteoblasts play a key role in the regulation of osteoclast function. Therefore, we asked whether *Pitx1* overexpression could interfere with the synthesis of paracrine osteoclast-regulating cytokines. Histochemical evaluation revealed that the number of TRAP-positive osteoclasts in the trabecular bone was decreased by 77.3% ($p = 0.013$) in TG females and by 58.3% in TG males ($p = 0.037$) compared with those in WT mice (Figs. 7A-C). Histomorphometric analysis revealed a decrease in the percentage of the trabecular surface that is occupied by osteoclasts (Oc.S/BS) in TG mice (21.8% decrease in TG females and 37.3% decrease in TG males; $p = 0.03$) when compared with WT mice (Fig. 7D).

Consistently, we observed a significant elevation in the levels of the plasma RANKL decoy receptor, osteoprotegerin (OPG) in TG mice (12070.1 ± 794 pg/ml, $p < 0.001$ in female TG mice and 9766.3 ± 794 pg/ml, $p < 0.001$ in male TG mice) compared with WT mice (7392.5 ± 359 pg/ml, $p < 0.001$ in females and 6899.5 ± 973 pg/ml, $p < 0.001$ in males) (Fig. 7E). There was a significant decrease in the levels of the osteoclastogenic cytokine RANKL in TG mice (42 ± 6.3 pg/ml, $p < 0.01$ in female TG mice and 55.2 ± 9.3 pg/ml, $p < 0.01$ in male TG mice) compared with WT mice (113.4 ± 20.7 pg/ml, $p < 0.01$ in females and 115.1 ± 38.5 pg/ml, $p < 0.001$ in males) (Fig. 7F), thus leading to a significant decrease in the RANKL/OPG ratio (Fig. 7G).

***Pitx1* overexpression inhibits the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway**

Osteoblast differentiation is predominantly regulated by the Wnt/ β -catenin signaling (canonical Wnt) pathway, which, together with bone morphogenetic proteins (BMP), acts as the master regulator of osteogenesis. Therefore, we asked whether *Pitx1* overexpression could interfere with the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Quantitative real-time PCR showed the transcript levels of *SOST* and *DKK1*, which are known inhibitors of Wnt signaling, were increased by 4.1-fold ($p=0.005$) and 6-fold ($p=0.0008$), respectively, in TG osteoblasts compared with WT (Fig. 8A). We further demonstrated a significant increase in the plasma DKK1 levels in TG mice (1759 ± 908 pg/ml, $p < 0.001$) compared with WT mice (621 ± 182 pg/ml, $p < 0.001$). No significant changes were observed in plasma SOST levels in TG mice (146 ± 24 pg/ml) compared with WT mice (180 ± 43 pg/ml) (Fig. 8B). In addition, *Gsk3 β* expression was also increased by 5.4-fold ($p=0.001$) in TG osteoblasts compared with controls (Fig. 10A). These results appear to implicate *Pitx1* as a negative regulator of the canonical Wnt signaling pathway. Consistently, western blot analysis showed a significant increase in phospho- β -catenin in the protein extracts of cultured TG osteoblasts compared with control cells (Fig. 8C). This further confirmed that *Pitx1* overexpression in TG mice inactivates the canonical Wnt signaling pathway by upregulating *DKK1*. Interestingly, *Colla1-Pitx1* mice treated with lithium chloride (LiCl), a known GSK3- β inhibitor, were protected from bone loss when compared with untreated mice (Fig. 9). Consistent with this observation, μ CT analysis demonstrated significant improvements mainly in the structural parameters of the trabecular bones of femurs harvested from 12-week-old TG mice treated with LiCl compared with untreated ones (Table 2).

Discussion

Our data demonstrate that PITX1 regulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in bone. We generated transgenic mice (*Colla1-Pitx1*) overexpressing *Pitx1* under the control of the 2.3-kb osteoblast *Colla1* promoter and observed a significant decrease in total body weight. Using high-resolution microCT, we detected altered cortical and trabecular bone architecture in the long bones of TG *Colla1-Pitx1* mice. Quantitative analysis of the bone structure of TG mice revealed a compromised microarchitecture of the bones along with a reduction in the bone mass and bone quality. There was a significant reduction in bone stiffness and strength. One striking feature of the transgenic phenotype is an altered mineralization due to the reduced quantity of bone matrix deposited by the TG osteoblasts. There is a significant reduction in the mineral apposition rate and the bone formation rate leading to decreased osteoid number and thickness (Supplemental Figure 1). The altered mineralization produces a mechanically weaker, immature, woven type of bone characterized by poor lamellation, which could explain the reduced stiffness and strength of the TG bones. This histomorphometric finding was supported by significantly reduced expression of osteoblast differentiation markers. Furthermore, increased *SOST* expression in TG bones suggests an altered maturation rate of osteoblasts into osteocytes, which may explain the altered mineralization observed *in vivo* and *in vitro* ⁽⁸⁾.

Interestingly, PITX1 also appears to contribute to the deregulation of osteoblast-osteoclast coupling. In fact, overexpression of PITX1 in osteoblasts increased their capacity to inhibit osteoclastogenesis by inducing the anti-osteoclastogenic factor, osteoprotegerin (OPG), as evidenced by the elevation of plasma

OPG levels and the reduction in osteoclast number in TG mice compared with WT ones. The parameters reflecting the structure and geometry of the trabecular bone clearly demonstrate the presence of plate-like structures in TG mice (Fig 2 B,D). This is likely the result of a concurrent decrease in osteoclast number and activity. This phenotype differs from the observations of previous studies that linked osteoporosis with more rod-like trabecular structures and increased osteoclastogenesis⁽⁹⁾.

A major finding of our study is that PITX1 is a novel negative regulator of the canonical Wnt/ β -catenin pathway by inducing the expression of *DKK1*, *SOST*, and *Gsk3 β* in TG mice, resulting in increased phosphorylation of β -catenin. The upregulation and increased secretion of DKK1 normally inhibits osteogenesis and promotes adipogenesis^(10, 11). It is therefore, somewhat surprising that we did not detect greater bone marrow adiposity in TG *Colla1-Pitx1* mice. *Pitx1* overexpression reduced the number of MSCs and blocked osteogenesis and adipogenesis. Perhaps, a reduction in the number of MSCs could be explained by the fact that PITX1 is a known transcriptional repressor of telomerase reverse transcriptase (TERT), which plays a role in the survival, growth, and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs)^(12, 13). Collectively, our data suggest that PITX1 exerts a dual action in mesenchymal precursor cells; it represses the canonical Wnt/ β -catenin signaling as well as mTert expression. This results in reduced MSC differentiation capacity as well as the maintenance of an undifferentiated state.

Understanding the role of PITX1 in regulating multipotent MSC differentiation may open avenues for developing novel therapeutic strategies. Given that osteoporosis is a complex and heterogeneous disease, future studies will be required to confirm

the role of PITX1 in human osteoporosis. It is likely that PITX1 upregulation is associated with an atypical subset of patients exhibiting severe bone loss.

Acknowledgements: We are grateful to Mrs. Josée Dépot and Ms. Charlotte Zaouter, for their excellent technical assistance. We thank the Center for Bone and Periodontal research of McGill University for the MicroCT-scan analyses and the three-point bending tests. Dr. Smitha S. Dutt participated in the writing and technical editing of the manuscript.

Authors' role: Study design: N K, B ST-J, A M; Study conduct: N K, J-F L, B ST-J, S B, A F; Data collection: N K, J-F L, A F, S B; Data analysis: N K, A M; Data interpretation: N K, J-F L, A F, B S, and A M; Drafting manuscript: all authors, N K and A M take responsibility for the integrity of the data analysis.

Conflict of interest: All authors report no conflicts of interest.

Figure Legends

Fig. 1 Transgenic *Colla1-Pitx1* mice exhibit growth retardation accompanied with bone loss. **A & B:** Comparative photo of both genders from 12-week-old *Colla1-Pitx1* and wild type mice. **C& F:** Growth curves of both genders of *Colla1-Pitx1* mice and their corresponding wild type littermates over a period of 28 weeks. **D-H:** Total bone mineral density (BMD) (g/cm²) and bone mineral content (BMC) (grams) of both genders of *Colla1-Pitx1* mice and their wild-type littermates during growth, determined by DEXA scan, over a period of 28 weeks. Data are presented as mean +/- SD for 5 mice from each gender in each genotype group. Asterisks indicate statistically significant difference (*p < .05).

Fig. 2 Transgenic *Colla1-Pitx1* mice exhibit an altered trabecular microarchitecture. **A-D:** Cross-sectional micro CT scans of both genders of femurs from 12-week-old *Colla1-Pitx1* and wild-type (WT) mice. **E-H:** Quantitative comparison of the trabecular bone parameters: Bone surface (BS)/Bone volume (BV); pattern factor (Pf); thickness (Th); structure model index (SMI). Data are presented as mean \pm SD for 5 mice from each sex in each genotype group. Asterisks indicate statistically significant difference (*p < .05; **p < .005; ***p < .0005).

Fig. 3 Transgenic *Colla1-Pitx1* mice exhibit altered cortical microarchitecture accompanied with a loss of bone strength. **A-D:** Cross-sectional microCT scans of both genders of femurs from 12-week-old *Colla1-Pitx1* and WT mice. **C-F:**

Quantitation of the cortical bone – Bone volume (BV)/trabecular volume (TV); BS/BV; Th, porosity. **G-I:** Three-point bending test quantitation – Stiffness; Ultimate Force; Work to ultimate point. Data are presented as mean \pm SD for 5 mice from each sex in each genotype group. Asterisks indicate statistically significant difference (* $p < .05$; ** $p < .005$; *** $p < .0005$).

Fig. 4 Impaired *in vivo* osteoblast number derived from 12-week *Colla1-Pitx1* mice. **A-D:** Goldner and Toluidine bleu staining on femur sections reveal a decreased number of osteoblasts and osteoids in *Colla1-Pitx1* mice. **E-G:** Histomorphometric quantitation of the osteoid surface (OS/BS), volume (OV/BV), and osteoblast surface (Ob.S BS). Data are presented as mean \pm SD for 5 mice from each gender in each genotype group. Asterisks indicate statistically significant difference (* $p < .05$; ** $p < .005$).

Fig. 5 Impaired *in vitro* osteoblast differentiation derived from 12-week-old *Colla1-Pitx1* mice when compared with their wild type littermates. **A & B:** ALP and Alizarin red staining of osteoblast cultures after 14 days of induction in osteogenic medium. **C:** Real-time PCR analysis of osteogenic markers (*Runx2*, *Osx*, *Alp1*, *Ocn* and *Spp1*) in osteoblasts on day 14 of osteogenic induction. Expression was normalized with that of wild type. **D:** Alizarin red staining of osteoblast culture after transfection with either siRNA targeting *Pitx1* (siRNA *Pitx1*) or scrambled sequence siRNA (Neg) used as a control. **F:** Alizarin red staining of osteoblast culture after infection with either lentivirus coding for PITX1 or DsRed as a control. **E & G:** Real-time PCR

analysis of osteogenic markers (*Runx2*, *Osx*, *Alp1* and *Spp1*) in osteoblasts. Expression was normalized with that of wild type.

Fig. 6 MSCs derived from 12-week-old *Colla1-Pitx1* mice display impaired osteoblast differentiation *in vitro* when compared with their wild type littermates.

A-C: Analysis of the colony-forming unit (CFU) number and osteogenic CFU-F number (ALP+CFU-F). **D:** Alizarin red staining of MSC cultures after 14 days of induction in osteogenic medium. **E:** Real-time PCR analysis of osteogenic markers (*Runx2*, *Osx*, *Alp1*, *Ocn* and *Spp1*) in MSCs. **F:** Alizarin red staining of MSC culture after transfection with either siRNA targeting *Pitx1* or scrambled sequence siRNA used as a control. **H:** Alizarin red staining of MSC culture after infection with either lentivirus coding for *Pitx1* or DsRed as a control. **G & I:** Real-time PCR analysis of osteogenic markers (*Runx2*, *Osx*, *Alp1*, and *Spp1*) in MSCs. Expression was normalized with that of wild type.

Fig. 7 Impaired *in vivo* osteoclast number and function in *Colla1-Pitx1* mice. **A-C:** TRAP activity staining and quantitation in femur sections of both genders from 12-week-old *Colla1-Pitx1* and wild type mice. **D:** Histomorphometric quantitation of the osteoclast surface (Oc.S BS) within trabecular bone areas. **E-G:** Quantitation of RANKL and OPG concentration. Data are presented as mean \pm SD for 5 mice from each sex in each genotype group. Asterisks indicate statistically significant difference (* $p < .05$, ** $p < .005$).

Fig. 8 Inactivation of the Wnt canonical pathway in *Colla1-Pitx1* mice. **A:** Real-time PCR analysis of Wnt canonical pathway markers sclerostin (SOST), Dickkopf-related protein 1 (DKK1), and glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β). Expression was normalized with that of wild type. **B:** Mean plasma levels of SOST and DKK1 in *Colla1-Pitx1* transgenic mice compared with that of wild type littermates. Asterisks indicate statistically significant difference (**p < .005; ***p < .0005). (C) Western blot of β -catenin vs phospho β -catenin obtained from protein extracts of cultured osteoblasts from *Colla1-Pitx1* transgenic mice compared with their wild type littermates.

Fig. 9 Transgenic *Colla1-Pitx1* mice treated with lithium chloride (LiCl) are protected from bone loss. **A-D:** Cross-sectional microCT scans of femurs from 12-week-old *Colla1-Pitx1* treated with 0.01M LiCl or 0.01 NaCl (control).

References

1. Mak YT, Hampson G, Beresford JN, Spector TD. Variations in genome-wide gene expression in identical twins - a study of primary osteoblast-like culture from female twins discordant for osteoporosis. *BMC Genet.* 2004;5:14.
2. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro- opiomelanocortin gene. *Genes Dev.* 1996;10(10):1284-95.
3. Lanctot C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development.* 1999;126(9):1805-10.
4. Marcil A, Dumontier E, Chamberland M, Camper SA, Drouin J. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development.* 2003;130(1):45-55.
5. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, et al. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* 1999;13(4):484-94.
6. Picard C, Azeddine B, Moldovan F, Martel-Pelletier J, Moreau A. New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;462:59-66.
7. Eleftheriou F, Yang X. Genetic mouse models for bone studies--strengths and limitations. *Bone.* 2011;49(6):1242-54.
8. Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR, et

- al. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(7):1425-36.
9. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5484):1504-8.
 10. Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Munoz J, Spees JL, et al. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1049:97-106.
 11. Gustafson B, Smith U. The WNT inhibitor Dickkopf 1 and bone morphogenetic protein 4 rescue adipogenesis in hypertrophic obesity in humans. *Diabetes*. 2012;61(5):1217-24.
 12. Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, et al. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(8):1624-36.
 13. Madonna R, Taylor DA, Geng YJ, De Caterina R, Shelat H, Perin EC, et al. Transplantation of mesenchymal cells rejuvenated by the overexpression of telomerase and myocardin promotes revascularization and tissue repair in a murine model of hindlimb ischemia. *Circulation research*. 2013;113(7):902-14.

Supplemental Data

1. Double labeling of calcein was used to analyze the dynamics of osteoblast activity and bone formation in the metaphysis of femurs. The distance between the two labeling lines was reduced in TG mice (Supplemental Figs. 1A-1D). Histomorphometric measurements showed that the mineralized surface to bone surface (MS/BS), bone formation rate/bone surface (BFR/BS), and the mineral appositional rate (MAR) were markedly reduced by 40%, 49.4%, and 22.2%, respectively, in TG females ($p < 0.01$) and by 49.1%, 56.3%, and 68.2%, respectively, in TG males ($p < 0.01$) (Figs. 5E-5H).

Materials and Methods

Calcein labeling and dynamic bone histomorphometry

Ten TG mice (females = 5; males = 5) and ten WT mice (females = 5; males = 5) of 12-week-old were injected with 2 intraperitoneal injections of calcein (10 mg/kg body weight) (Sigma- Aldrich Canada Co., ON, Canada) at 10 and 3 days prior to sacrifice. The right femurs and tibias were fixed with 70% ethanol overnight and dehydrated in a graded ethanol series. The bones were embedded in methyl methacrylate (MMA) for analyzing bone formation parameters. Mid-frontal sections of the distal tibia and femur with 6 μm thickness were used for toluidine blue staining or Goldner's trichrome staining. Sections of 10 μm thickness were used for fluorescence observation. The left femurs and tibias were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C overnight and decalcified before embedding in paraffin. The 6 μm thick sections

were stained for osteoclasts using tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) (Sigma-Aldrich Canada Co.). OsteoMeasure (Osteometrics, Inc., GA, USA) bone analysis software was used for histomorphometric analyses.

Figure Legend

Supplemental Figure 1 Impaired *in vivo* osteoblast function derived from 3-month-old *Colla1-Pitx1* mice. **A-D:** Dynamic histomorphometric analysis of femurs from 3-month-old *Colla1-Pitx1* and wild type mice. **E-D:** Dynamic histomorphometric quantitation of the bone formation rate (BFR/BS), the mineralizing surface (MS/BS), and the mineral apposition rate (MAR). Data are presented as mean +/- SD for five mice from each gender in each genotype. Asterisks indicate statistically significant difference (* $p < .05$; ** $p < .005$).

2. Given that MSCs can differentiate into osteoblasts and adipocytes, and the fact that adipogenesis is enhanced in some models of bone loss, we investigated the capacity of TG MSCs to differentiate into adipocytes. Cultured TG MSCs in adipogenic differentiation media exhibited a significant reduction in the number of lipid-filled mature adipocytes, and a significant reduction in the expression of adipocytic markers like *Ppar γ* , *Cebp*, *Adipoq*, *aP2* compared with WT MSCs under the same conditions (Supplemental Figs. 2A, 2B).

Materials and Methods

Adipocyte differentiation assay

The mesenchymal stem cells (MSCs) were plated at a density of 2×10^5 cells/cm² in 6-well microplates in AMEM (10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic solution). To induce the production of adipocytes, the medium was supplemented with 1 μ M dexamethasone, 5 μ g/ml insulin, 50 μ M indomethacine, and 0.5 μ M isobutyl methylxanthine. The media was changed every 4 days over 2 weeks, and the adipocytes were then visualized using oil red 'O' staining.

Supplemental Figure 2 MSCs derived from 12-week-old *Colla1-Pitx1* mice displayed impaired adipocyte differentiation *in vitro* when compared with their wild-type littermates. **A:** Oil red O staining of MSC cultures after 11 days of induction in adipogenesis medium. **B:** Real-time PCR analysis of adipocytic markers (*Ppar γ* , *Cebp*, *Adipoq* and *aP2*) in MSCs. Expression in real-time PCR analysis was normalized in comparison with wild type. Asterisks indicate statistically significant difference (* $p < .05$; ** $p < .005$).

Tables

Table 1: Oligonucleotides used for quantitative real time PCR

Gene	Nucleotide sequence
<i>Pitx1</i>	F: 5'-GCCTCAACCCGTGAACTGAA-3' R: 5'-GCGTAAACTCCAGCAGTGAT-3'
<i>Runx2</i>	F: 5'-GCTATTAAAGTGACAGTGGACGG-3' R: 5'-GGCGATCAGAGAACAACTAGG-3'
<i>Alp1</i>	F: 5'-ACTGATGTGGAATACGAACTGG-3' R: 5'-AGTTCAGTGCGGTTCAG-3'
<i>Sp7</i>	F: 5'-CCCAGCTCGAGGATGGCGTC-3' R: 5'-AGGGAGCTGGGTAGGCGTCC-3'
<i>Ocn</i>	F: 5'-AGATGCCAAGCCCAGCGGC-3' R: 5'-CCTGCACGTCTAGCCCTCTG-3'
<i>Spp1</i>	F: 5'-GTGATTTGCTTTTGCCTGTTTG-3' R: 5'-GAGATTCTGCTTCTGAGATGGG-3'
<i>Pparγ</i>	F: 5'-ATAGGTGTGATCTTAACTGCCG-3' R: 5'-CCAACAGCTTCTCCTTCTCG -3'
<i>Cebp</i>	F: 5'-CATGCCGGGAGAACTCTAAC -3' R: 5'-CTGGAGGTGACTGCTCATC-3'
<i>Adipoq</i>	F: 5'-TGTCTGTACGATTGTCAGTGG-3' R: 5'-GCAGGATTAAGAGGAACAGGAG-3'
<i>Ap5</i>	F: 5'-GACAGGAAGGTGAAGAGCATC-3' R: 5'-GTCACGCCTTTCATAACACATTC-3'
<i>Sost</i>	F: 5'-ACAACCAGACCATGAACCG-3' R: 5'- CAGGAAGCGGGTGTAGTG-3'
<i>Dkk1</i>	F: 5'- CACCATCAAGCCAGCAATTC-3' R: 5'- CTGAAGATTCCTACATCCTTGGG-3'
<i>Gsk3-β</i>	F: 5'- CACCTGCACTCTTCAACTTTAC-3' R: 5'- CACGGTCTCCAGCATTAGTATC-3'
<i>β actin</i>	F: 5'-ACCTTCTACAATGAGCTGCG-3' R: 5'-CTGGATGGCTACGTACATGG-3'

Table 2: Lithium treatment of transgenic *Collα1-Pitx1* mice improves trabecular bone architecture parameters.

A

	Female		p value	Male		p value
	Treated Collα1-Pitx1 with 0.01M NaCl	Treated Collα1-Pitx1 with 0.01M LiCl		Treated Collα1-Pitx1 with 0.01M NaCl	Treated Collα1-Pitx1 with 0.01M LiCl	
Trabecular bone						
Percent bone volume BV/TV (%)	9 ± 2.4	26.3 ± 8.7	1.9 E-06	19.4 ± 6.1	37.1 ± 15.8	0.002
Trabecular pattern factor Tb.Pf (1/mm)	27.8 ± 4.6	11.8 ± 4.6	1.1 E-07	17.8 ± 6.3	2.5 ± 10.5	0.0006
Trabecular thickness Tb.Th (mm)	0.07 ± 0.007	0.08 ± 0.01	0.01	0.06 ± 0.009	0.08 ± 0.02	0.02
Trabecular separation Tb.Sp (mm)	0.3 ± 0.04	0.2 ± 0.05	7.4 E -05	0.2 ± 0.01	0.16 ± 0.06	0.11
Bone surface / volume ratio BS/BV (1/mm)	64.3 ± 6.2	49.7 ± 8.6	7.7 E-05	58.4 ± 8.8	46 ± 14.2	0.01
Structure model index SMI	2.8 ± 0.2	1.5 ± 0.6	3.6 E-06	2 ± 0.3	1 ± 0.7	0.0008
Trabecular number Tb.N (1/mm)	1.3 ± 0.3	3.3 ± 0.9	5.2 E-07	2.8 ± 0.5	4.3 ± 1.1	0.001

Figures

Figure 1: Transgenic *Col1a1-Pitx1* mice exhibit growth retardation accompanied with bone loss

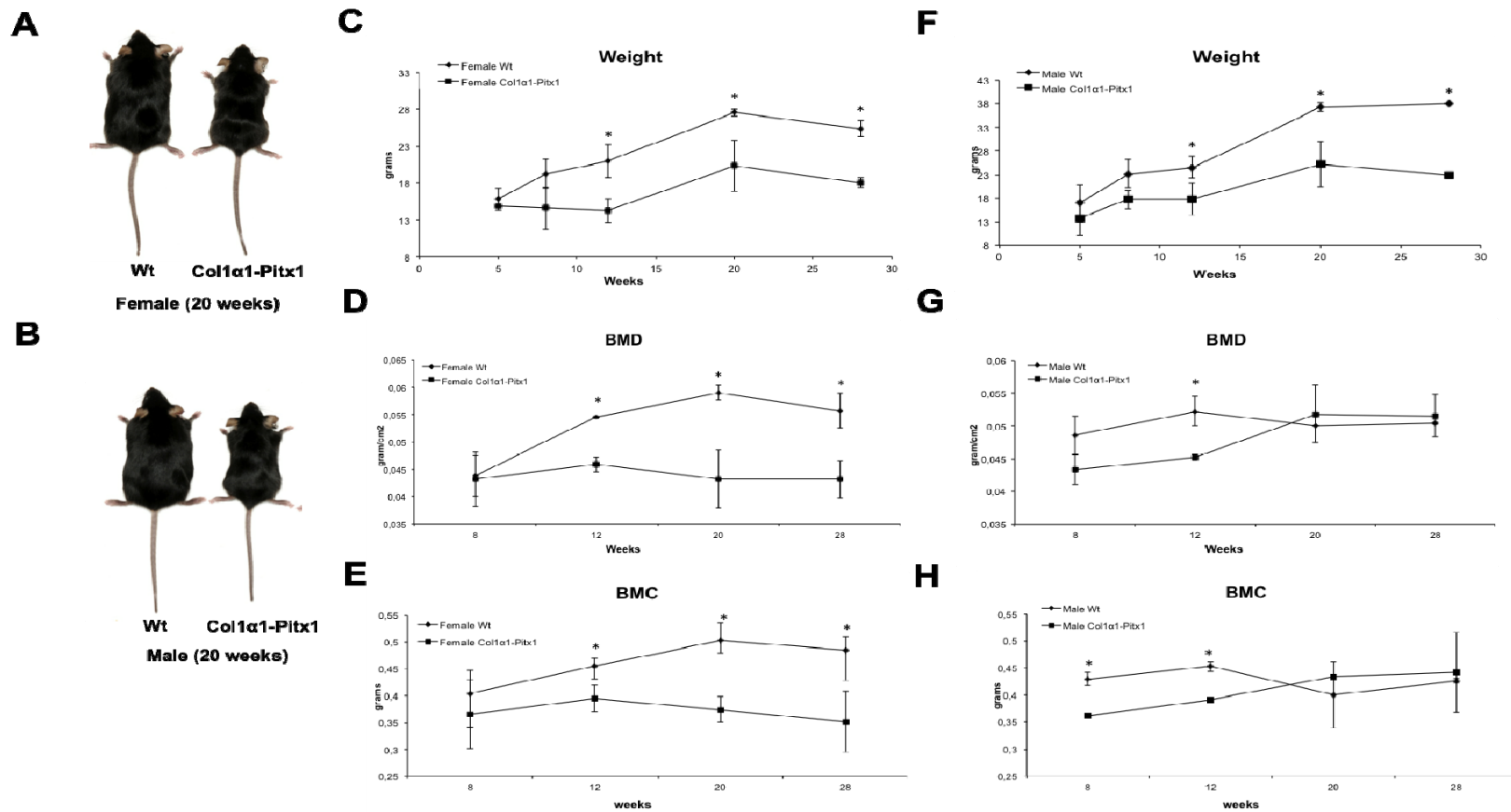


Figure 2: Transgenic *Col1a1-Pitx1* mice exhibit an altered trabecular microarchitecture

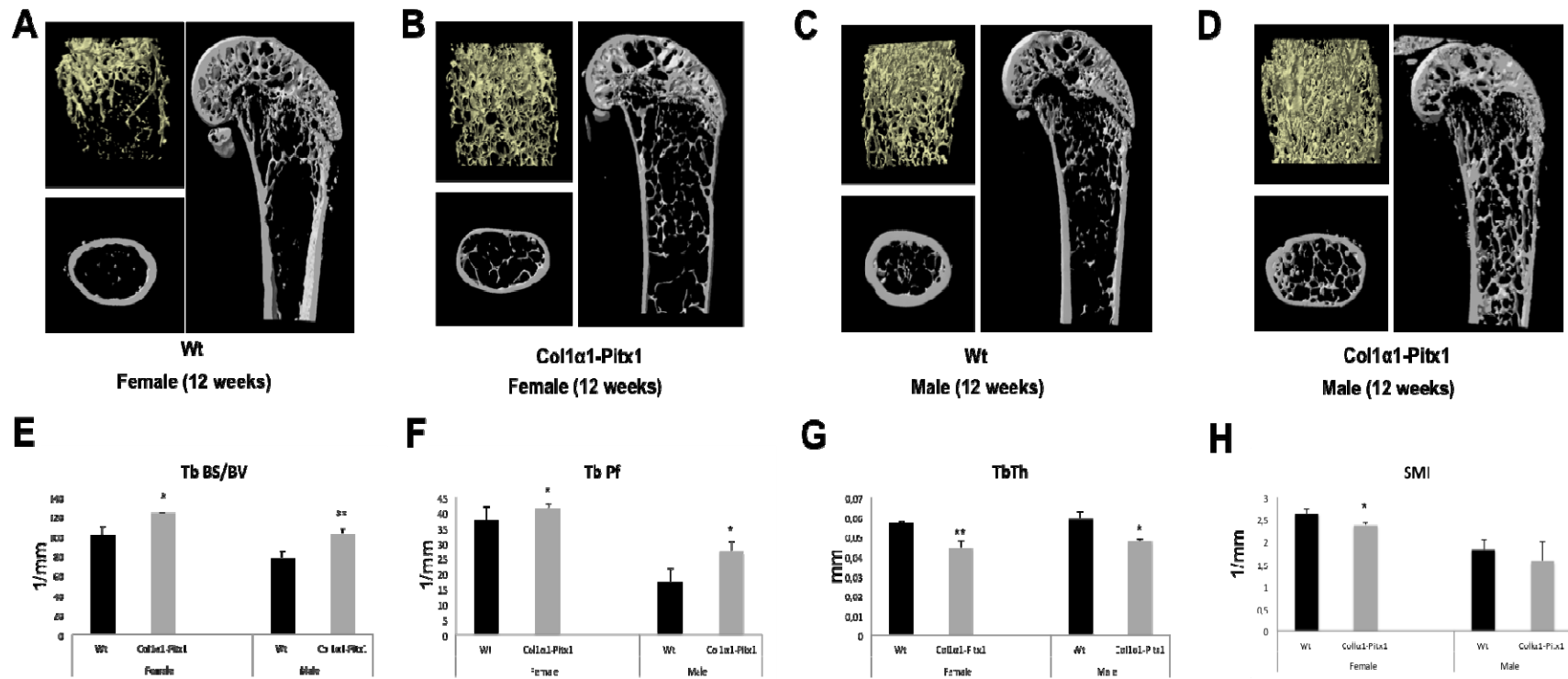


Figure 3: Transgenic *Col1a1-Pitx1* mice exhibit altered cortical microarchitecture accompanied with a loss of bone strength

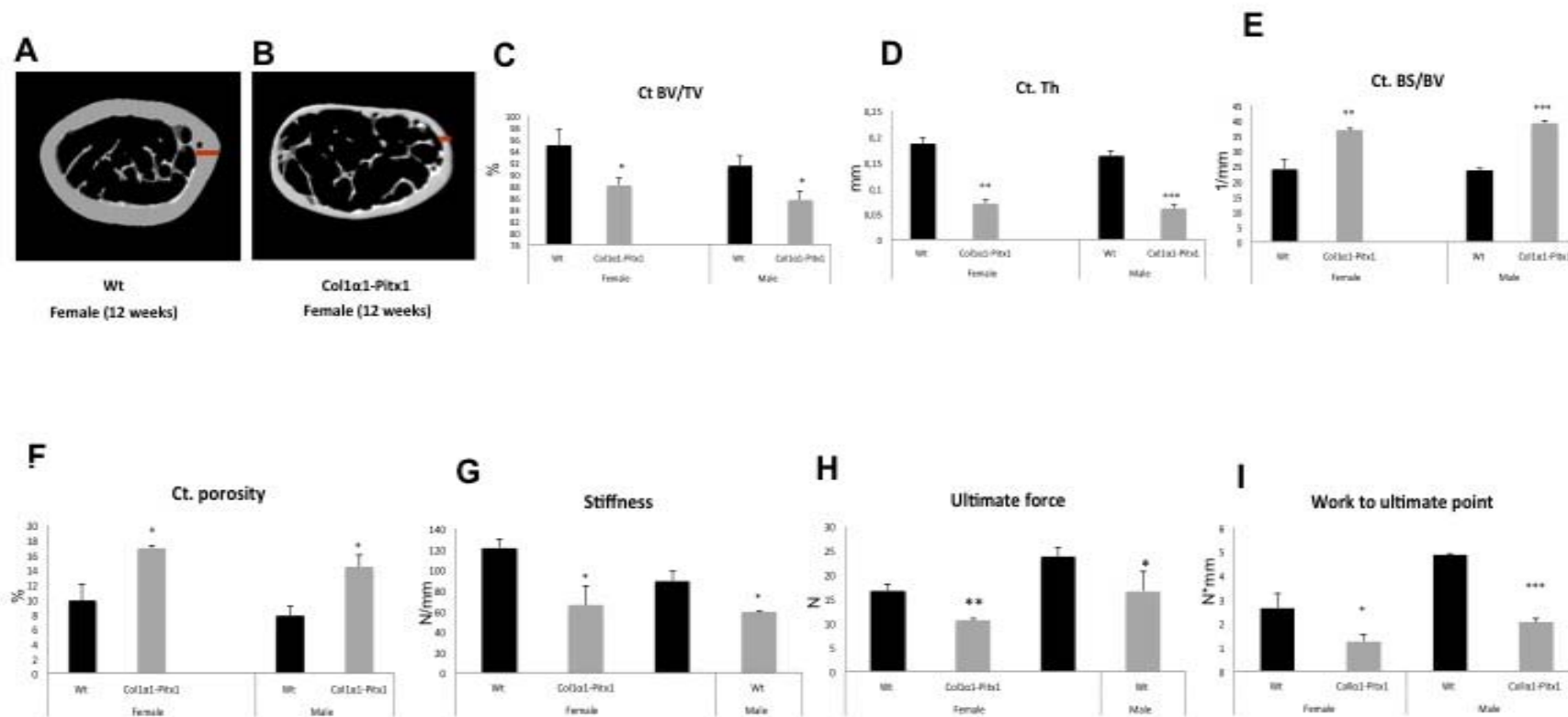


Figure 4: Impaired *in vivo* osteoblast number derived from 12-week *Col1a1-Pitx1* mice

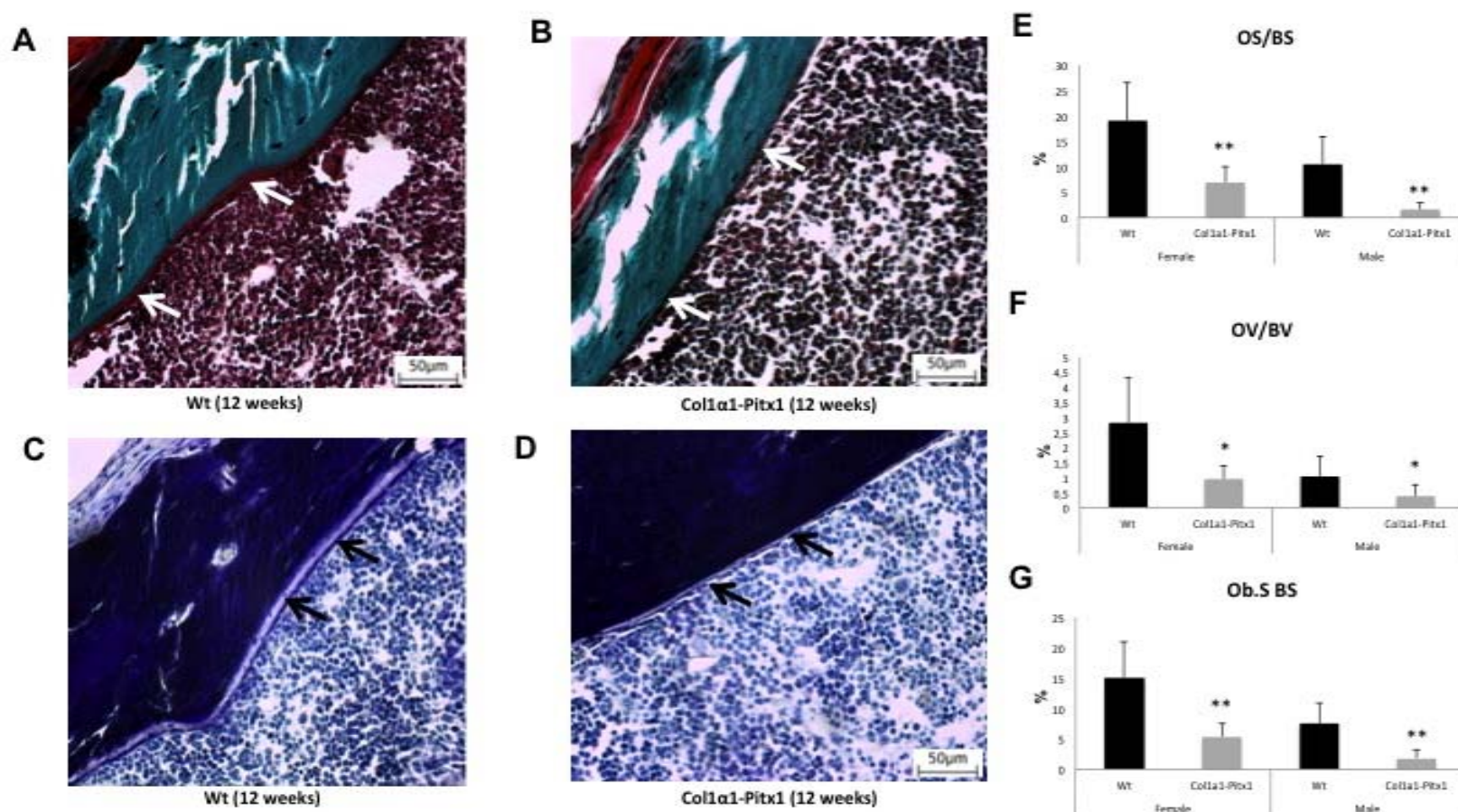


Figure 5: Impaired *in vitro* osteoblast differentiation derived from 12-week old *Col1 α 1-Pitx1* mice when compared with their wild-type littermates

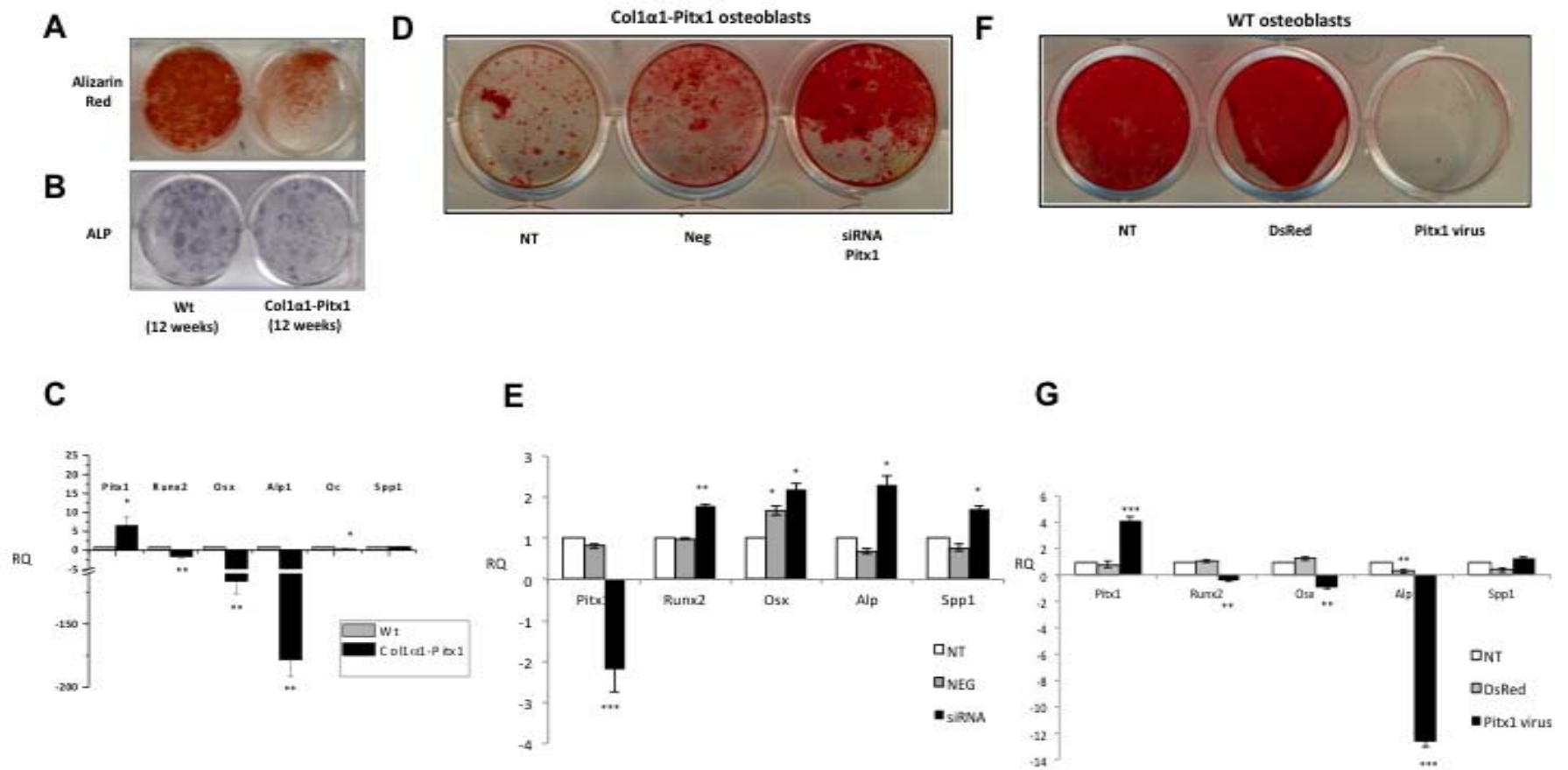


Figure 6: MSCs derived from 12-week old *Coll1a1-Pitx1* mice display impaired osteoblast differentiation *in vitro* when compared with their wild-type littermates

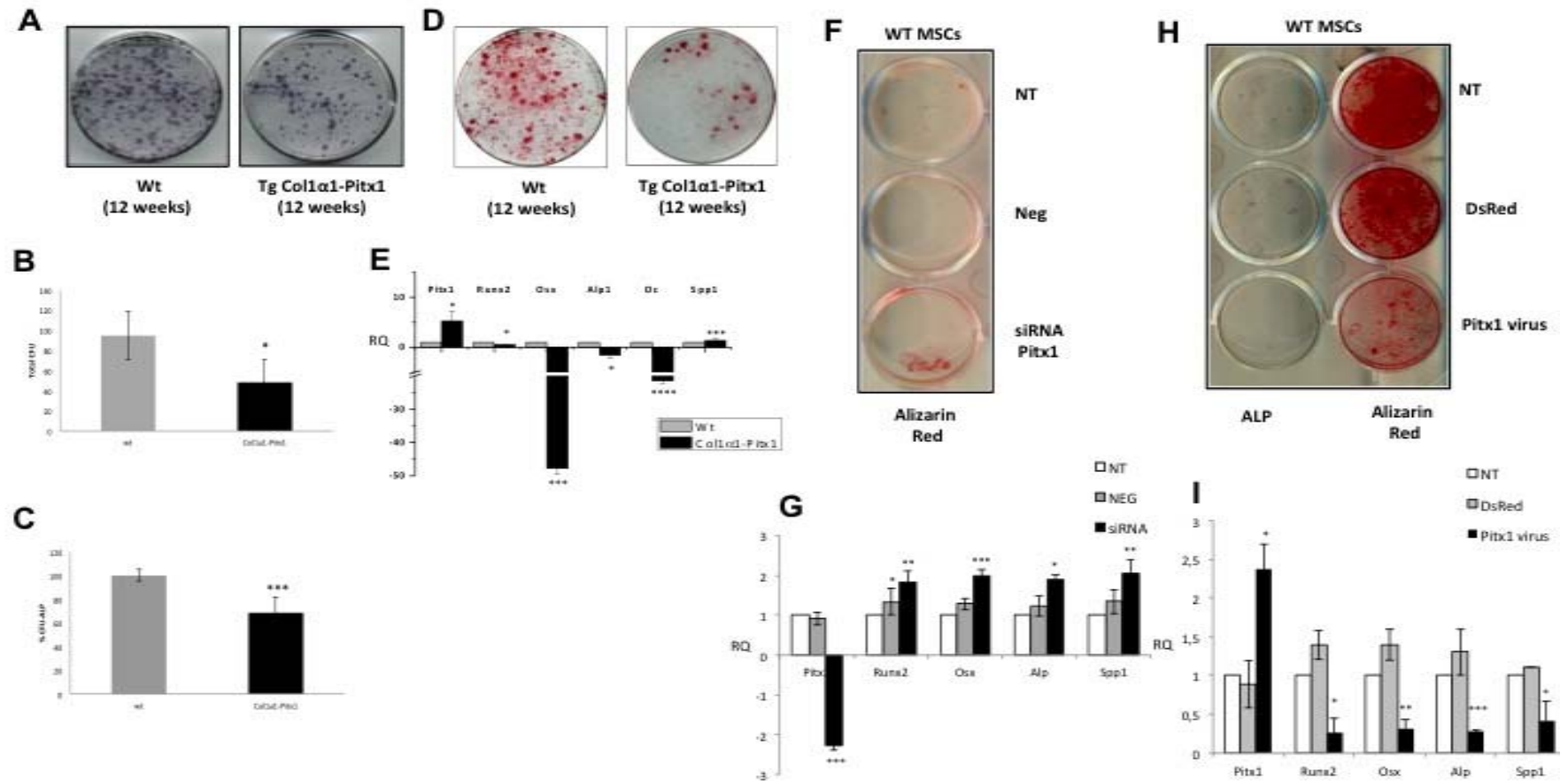


Figure 7: Impaired *in vivo* osteoclast number and function of *Col1-Pitx1* mice

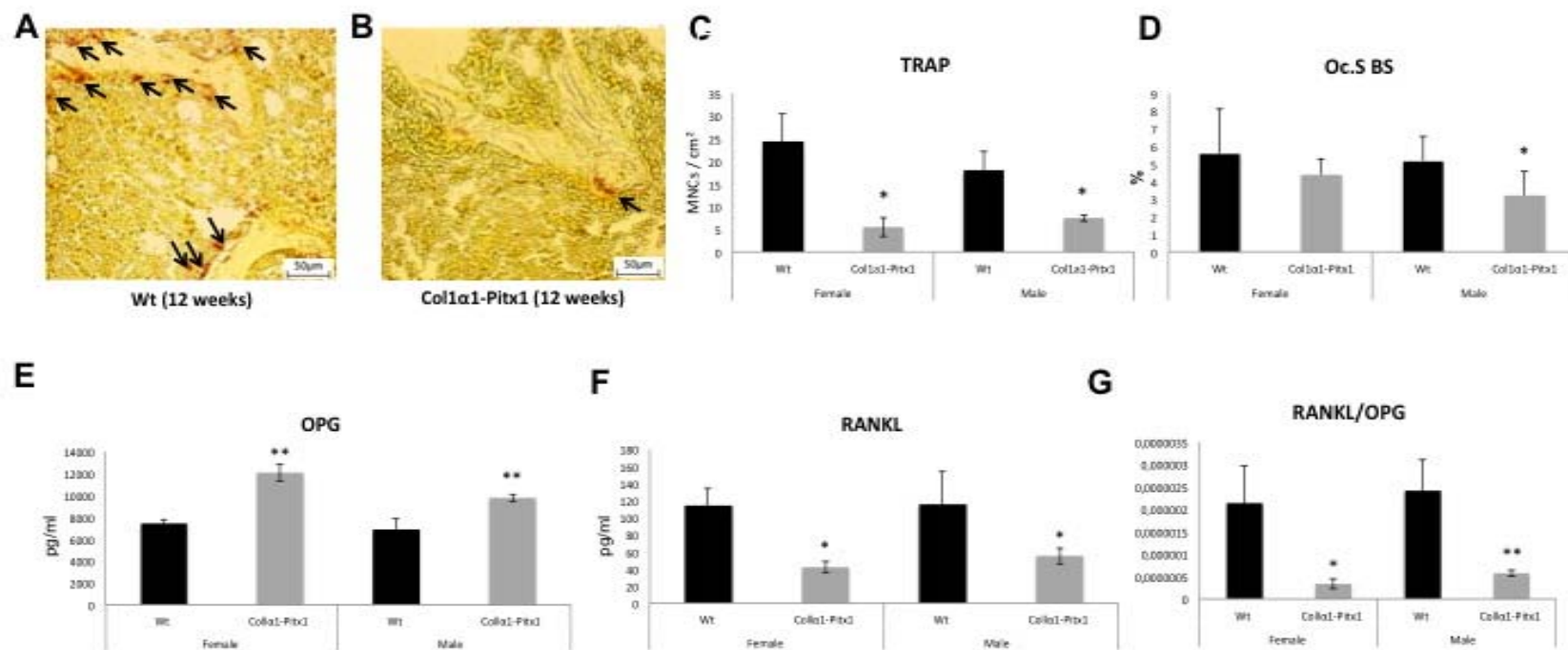


Figure 8: Inactivation of the Wnt canonical pathway in *Col1 α 1-Pitx1* mice

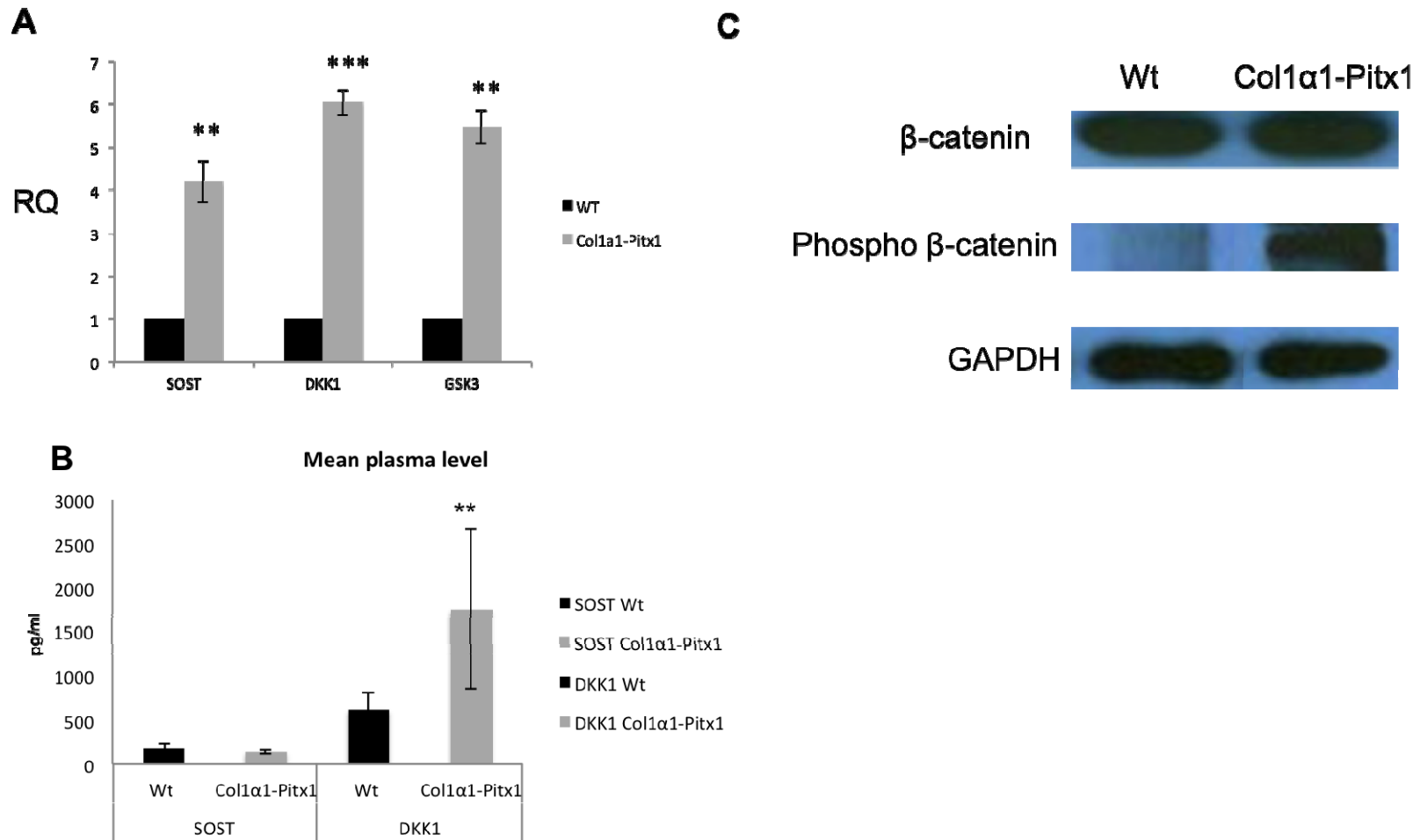
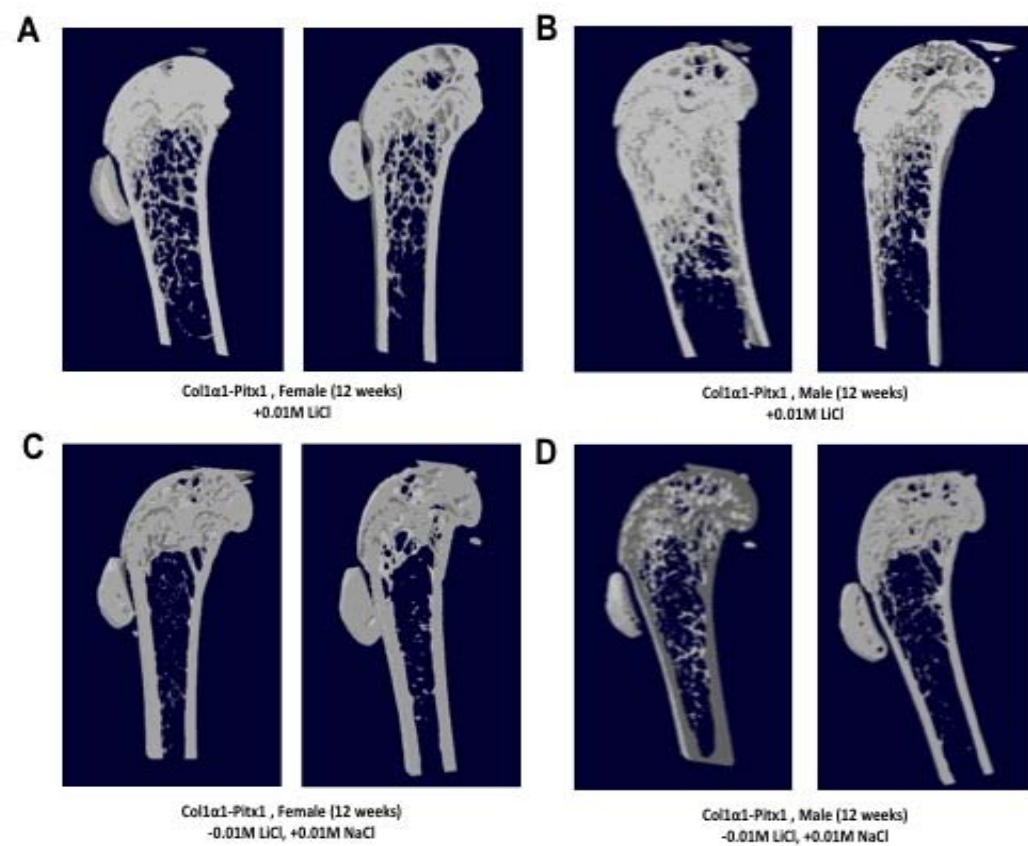
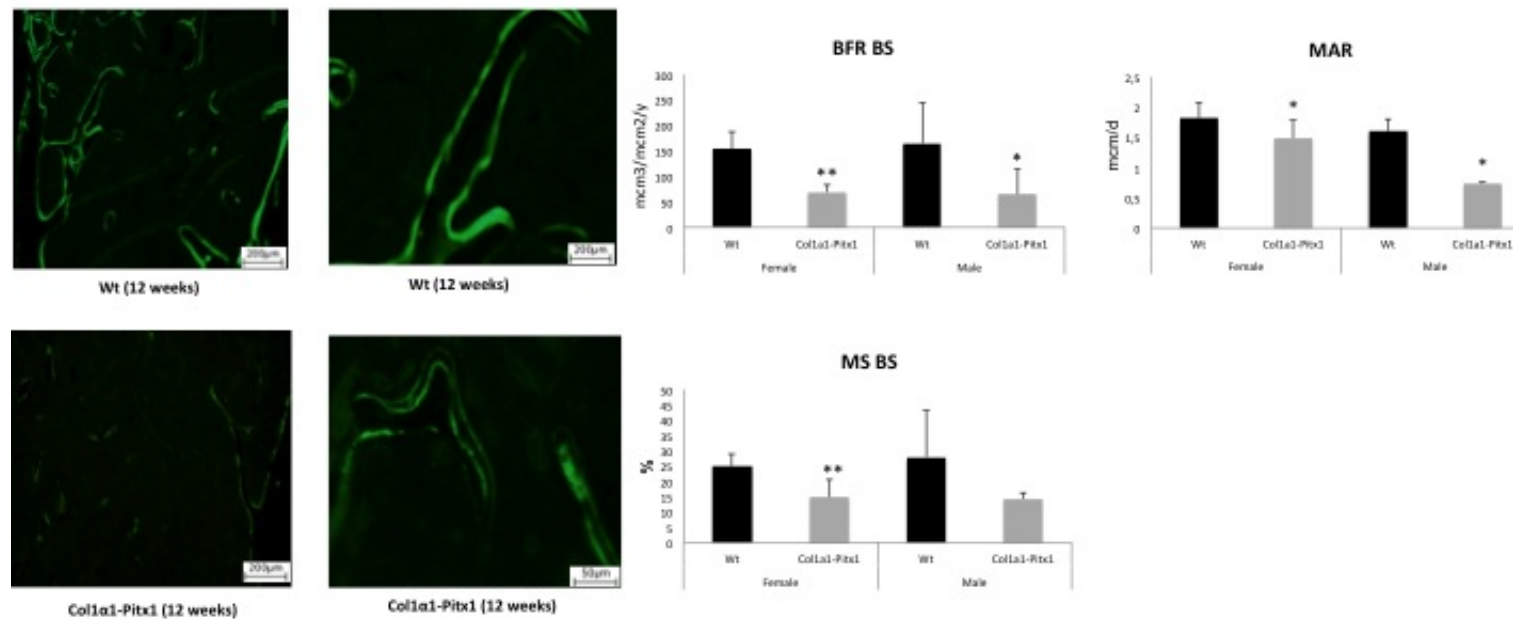


Figure 9: Transgenic *Col1a1-Pitx1* mice treated with lithium chloride (LiCl) were protected from bone loss

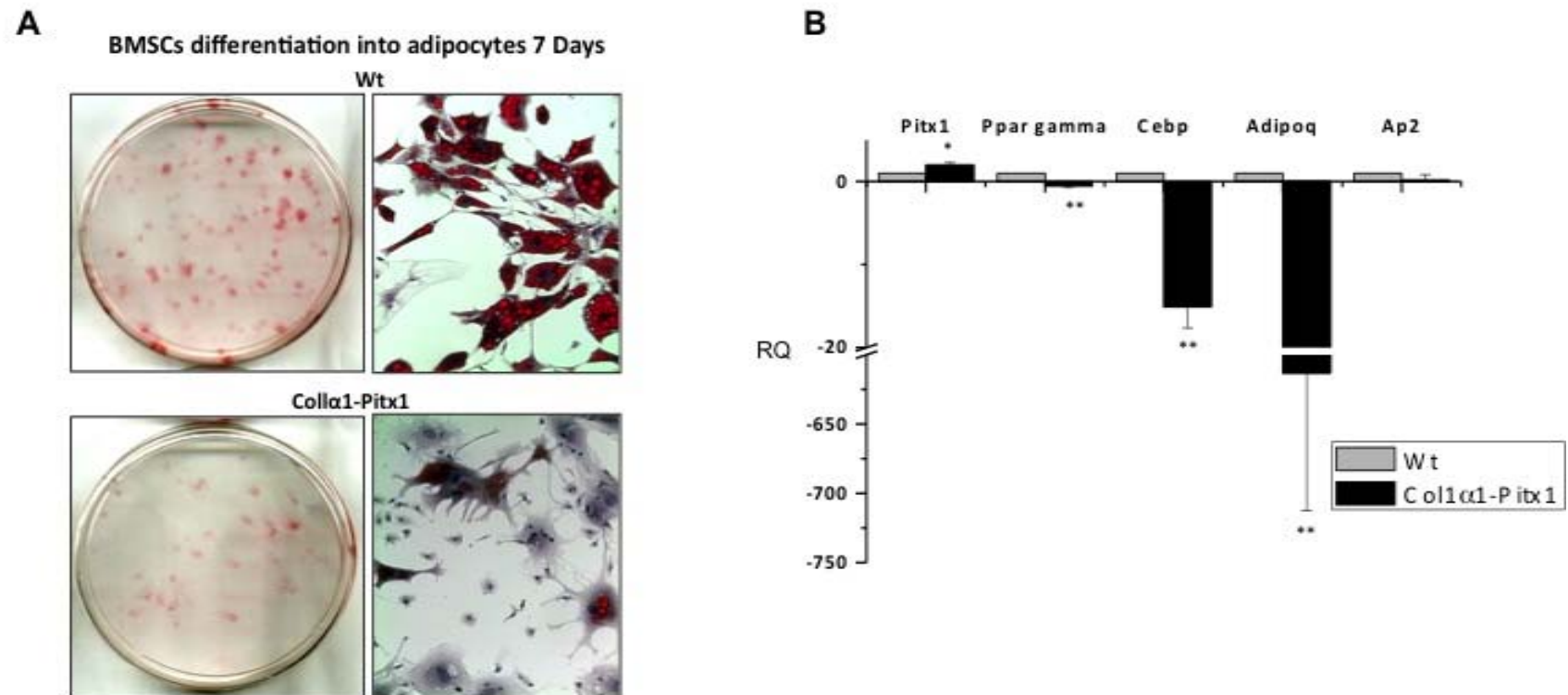


Supplemental Figures

Supplemental Figure 1: Impaired in vivo osteoblast function derived from 12-week- old *Col1a1-Pitx1* mice



Supplemental Figure 2: MSCs derived from 12-week-old *Collα1-Pitx1* mice display impaired adipocyte differentiation *in vitro*



Préface au chapitre 3

Ce chapitre, sous forme d'article, fait suite logique au premier l'article présenté dans le chapitre précédent. Ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit, qui sera soumis en Decembre 2015 au Journal of Bone and Mineral Research (JBMR).

Dans le cadre de ce deuxième article, nous avons montré que les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* développent non seulement de l'ostéoporose au niveau bucco-dentaire mais également un phénotype reproduisant ce qui est observé chez des patients atteints de maladies parodontales.

En effet, plusieurs études récentes ont montré l'impact de l'ostéoporose sur les maladies parodontales, la résorption alvéolaire et la perte des dents. Étant donné que *Pitx1* est exprimé lors du développement embryonnaire dans les membres postérieurs, la mandibule et les dents, la santé buccale des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* a été étudiée. L'analyse des résultats a montré des signes de maladies parodontales sévères, similaires à ceux trouvés chez les patients atteints de maladies parodontales.

J'ai réalisé toutes les expériences de ce projet. Dr Gabriel Leduc, chirurgien dentiste, cité comme deuxième auteur m'a aidé dans le diagnostique de la parodontite présent chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*.

J'ai écrit le manuscrit, qui a été par la suite revue et corrigé par le Dr Moreau.

Chapitre 3 : Article #2

La surexpression du facteur de transcription PITX1 dans les souris ostéoporotiques *Colla1-Pitx1* induit une altération du phénotype dentaire et évoque une parodontite

Title page: Overexpression of Transcription Factor PITX1 in Osteoporotic *Colla1-Pitx1*

Mice Induces Tooth Defects and Evokes a Periodontitis-Like Phenotype

Nancy Karam^{1,2}, M.Sc., Gabriel Leduc³, D.M.D., Benoit St-Jacques¹, Ph.D. Alain Moreau¹,

^{2,4}, Ph.D.

¹Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Centre, Montréal, QC, Canada;

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

³Clinique Dentaire Saint-Eustache, Saint-Eustache, QC, Canada;

⁴Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

Running title: Overexpression of PITX1 induces periodontitis-like phenotype in osteoporotic mice

Corresponding author: Professor Alain Moreau, PhD, CHU Sainte-Justine Research

Center, 3175 Cote-Sainte-Catherine Road, Montreal, QC, H3T 1C5, Canada.

Abstract

Osteoporosis is a progressive bone disease that is often associated with oral health problems. The mechanisms regulating the link between both osteoporosis and oral health are not fully understood. Several studies suggest a role for the transcription factor PITX1 in bone, mandibular, and tooth development. Recently, we demonstrated that the overexpression of *Pitx1* in bones of transgenic mice *Colla1-Pitx1* leads to an osteoporosis-like phenotype. This prompted us to investigate the role of PITX1 in the oral health of the transgenic mice. Osteoporotic transgenic *Colla1-Pitx1* mice exhibited severe malocclusion and dental abnormalities as revealed by high definition photos and radiographic analyses. Dual-energy-X-ray absorptiometric (DXA) scanning revealed a significant decrease in bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) in transgenic mice mandibles compared with those of wild type mice. Biomechanical assessment revealed reduced bone strength in *Colla1-Pitx1* mandibles. Alveolar crest height (ACH) and mobility testing revealed an early onset of periodontal breakdown of the *Colla1-Pitx1* periodontium. Histological analysis showed combined periodontal-endodontic lesions in the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice teeth. At the cellular level, histological analysis showed a decrease in cementoblast and odontoblast numbers as well as hypomineralization of dental hard tissues in osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice compared with wild type mice. Finally, our data show that *Pitx1* overexpression induces an osteoporosis-like phenotype accompanied by oral bone loss, dental and periodontal problems, and edentulousness. Together, these findings confirm the role of PITX1 in regulating bone mass and as a link between osteoporosis and periodontal diseases.

Keywords: PITX1, odontoblasts, cementoblasts, oral bone loss, periodontal diseases.

Introduction

Osteoporosis is a systemic bone disorder leading to decreased bone mass and a high rate of fractures due to decreased bone strength.⁽¹⁾ Osteoporosis is considered a possible risk factor for periodontal disease progression as it triggers alveolar bone loss and loss of teeth.⁽²⁻⁵⁾

Periodontal diseases are highly prevalent chronic immune-inflammatory conditions of the periodontium. It begins as gingivitis, an inflammation of the soft tissues. During the progressive development of periodontitis, loss of gingival tissue, the periodontal ligament, and adjacent supporting alveolar bone can result, in some cases, in tooth loss.⁽⁶⁾ Studies show that 75% to 95% of all adults are affected by some stage of periodontitis. However, the severe forms of chronic periodontitis affect approximately 5% to 20% of individuals in most populations.⁽⁷⁾ The mechanisms that underpin the link between osteoporosis and periodontal diseases are not completely understood although genetic factors could predispose an individual to develop both the diseases.

Recently, in parallel study, we reported that transgenic *Colla1-Pitx1* mice overexpressing *Pitx1* under the 2.3 kb collagen type-I promoter fragment develop severe osteoporosis (Karam et al., 2015 manuscript submitted to JBMR). Furthermore, we demonstrated that plasma Dickkopf 1 (DKK1) levels were increased in TG mice and led to the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. Of note, inhibition of Wnt signaling was reported to impair odontogenic development leading to microdontia in mice.⁽⁸⁾

Interestingly, PITX1 is a bicoid-related homeodomain factor that is preferentially expressed in the developing hind limbs, mandibles, and teeth.^(9,10) Given that *Pitx1* is exclusively expressed in the proximal part of the developing mandible, where the molars develop, its genetic ablation in *Pitx1*-KO mice consequently led to hypoplastic mandibular molars with fewer cusps while the maxillary molars appeared normal.⁽¹⁰⁾

In this study, we characterize the oral health of adult transgenic *Colla1-Pitx1* mice and investigate the effect of PITX1 overexpression on different dental compartments. Our findings provide evidence that osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice exhibit a severe periodontitis-like phenotype accompanied by loss of teeth.

Materials and Methods

Generation of *Colla1-Pitx1* mice

Recently, in parallel study, transgenic (TG) mice overexpressing *Pitx1* in pre-osteoblasts, osteoblasts, and odontoblasts (*Colla1-Pitx1*) were generated using the 2.3 kb fragment of the *Colla1* gene promoter (Karam et al., 2015 manuscript submitted to JBMR). Indeed, in previous studies, transgenic mice harboring a 2.3 kb proximal fragment of mouse or rat *Colla1* promoter showed a high activity of the transgene in bone-forming cells (osteoblasts) as well as in the dentin-forming cells (odontoblasts) in teeth.⁽¹¹⁻¹⁵⁾ Of note, this study reported that these transgenic *Colla1-Pitx1* mice develop severe osteoporosis (Karam et al., 2015 manuscript submitted to JBMR). All the experiments using mice were performed according to protocols approved by the Animal Ethics Committee of the CHU Sainte-Justine University Hospital Research Center.

Imaging methods and dual-energy X-ray absorptiometry

Twenty-four mice were analyzed at 3 months (12 WT and 12 TG mice, 6 males and 6 females for each genotype). High definition photos of the skulls, mandibles, and teeth were taken. High-resolution lateral and dorsoventral radiographs of the mice skulls were obtained using a Faxitron MX20 (Faxitron Corp, IL, USA). Two cephalometric variables, the lateral deviation of the maxillary and mandibular bones from the midline, were examined. This was defined by the shift in the contact points of the maxillary or the mandibular incisors to the left or right from the perpendicular bisector of the line segment between the left and right posterior apices of the external occipital crest. The alveolar crest height (ACH) was assessed using the Faxitron MX20 (Faxitron Corp, IL, USA) software. The ACH represents the distance from the cemento-enamel junction (CEJ) to the top of the alveolar bone crest (ABC) adjacent to the tooth. The ACH was measured at two sites per tooth and is reported as the average loss of bone height of all teeth.

The bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) of each maxilla and mandible were measured using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA; PIXIMus II densitometer; GE Healthcare, WI, USA).

Bone material and biomechanical properties

Freshly dissected mandibles of 3-month old mice (WT – n = 12; TG – n = 12) were used for testing their biomechanical strength using a three-point bending test performed on a Mach-1TM micro-mechanical testing system (Biosyntech Inc., Quebec, Canada). The extrinsic parameters, such as stiffness (N/mm) and work to ultimate point (N*mm) were extracted from a force displacement curve. The displacement resolution was 0.1 μ m, the travel range was 25 mm, the ramp velocity was 50 μ m/s, the load cell resolution was 0.5 g for \pm 10 kg, and the fixed relaxation time was 60 s.

Periodontal examination

The mobility of the molars was tested by applying pressure with forceps and trying to rock the tooth gently in all the directions. The mobility was classified as follows: no mobility, moderate mobility (buccal-palatal), and severe mobility (vertical movement, the teeth moves in and out of the socket). For histological analysis, the mandibles were excised, decalcified, fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h, and embedded in paraffin. Sections measuring 4 μ m in thickness were then stained with haematoxylin/eosin solution.

Statistical analysis

The data were evaluated statistically in SPSS Windows, version 10.0. The results are shown as mean \pm standard deviation (SD). The statistics were assessed using Student's *t* test and the *p* values were considered significant at * *p* < 0.05, ** *p* < 0.0005, and *** *p* < 0.00005.

Results

Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice display striking teeth defects

To understand the effects of *Pitx1* overexpression on jaw and tooth development, the oral health of transgenic *Colla1-Pitx1* mice was examined. Malocclusion spontaneously occurs in all the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice. This was shown by an improper alignment of the maxillary and the mandibular incisors (Fig. 1A). High-definition photos of excised jaws of transgenic mice revealed an altered morphology and color of the mandibular and maxillary molars compared with their WT littermates. The TG molars were yellowish, demonstrated enamel hypoplasia, and hypocalcification (Fig. 1B). The TG molars also showed altered crown morphology with rounded cusp tips and increased wear along all occlusal surfaces (Fig. 1B). Moderate to severe mobility was detected in all the molars of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice. As a result, the molars displayed a loss of interproximal contact point (diastema formation) and migration in the buccal direction. Furthermore, since the degree of mobility is inversely related to the amount of alveolar bone and periodontal ligament support left, missing molars were seen in several osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice (Fig. 1B). Conversely, no mobility was detected in any of the molars of the wild-type mice, which were aligned to each other with a straight line connecting their interproximal contact points.

Transgenic *Colla1-Pitx1* mice exhibit severe malocclusions, decreased bone mass, and spontaneous fractures of the jawbone

Radiographic evaluation of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice skulls revealed that all TG mice exhibited severe malocclusions as shown by a significant shift between the contact point of the

left and right maxillary incisors (Mx) and the contact point of the left and right mandibular incisors (Md) from the midline (Fig. 2A). This misalignment prevents normal wear of the teeth. Consistently, the maxilla and the mandible of the transgenic mice appear dramatically affected with distinct signs of bone destruction whereas the alveolar bone appeared extremely porous as demonstrated by its radiolucent appearance (Fig. 2B). The total BMC and total BMD measurements in TG mice demonstrated a significant bone loss of 30.5% ($p = 0.03$) and 15.3% ($p = 0.04$), respectively, in the maxilla as well as a reduction of 18.4% ($p = 0.001$) and 26.2% ($p = 0.007 \times 10^{-2}$), respectively, in the mandibles of *Colla1-Pitx1* mice compared with their wild type littermates (Figs. 2B-2D). In fact, upon radiographic examination, 70% of all the *Colla1-Pitx1* mice skulls demonstrated pathologic mandibular fractures (Fig. 2E). This observation prompted us to measure the biomechanical resistance of the mandibles of TG mice. Results obtained from the three-point bending test showed that stiffness and the work to ultimate breakpoint were significantly decreased by 37.7% ($p = 0.03$) and 56.5% ($p = 0.026$), respectively, in the mandibles of the *Colla1-Pitx1* mice compared with the wild type ones (Figs. 2F, 2G). Taken together, these results show that *Pitx1* overexpression induced a bone loss phenotype in both jaws accompanied by loss of teeth.

Transgenic *Colla1-Pitx1* mice develop early onset periodontal breakdown

Radiographic examination of *Colla1-Pitx1* mice revealed a loss of at least one molar in 22% of the cases (Fig. 3A). Radiographs also showed marked attrition of incisor surfaces and molar cusps. The radiodensities of dentin and enamel were significantly lower in the radicular and coronal regions of the teeth (Fig. 3B). The roots of the teeth of osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice showed an altered morphology, presumably resulting from external resorption. Signs of

inflammation and remodeling of the periodontium were seen in the transgenic mice. The periodontium exhibited significant widening of the periodontal ligament space, a loss of lamina dura, and an uncontrolled loss of basal and alveolar bone density over extensive areas (Fig. 3B). This was accompanied by an obvious decrease in the furcal bone height (Fig. 3C). To assess oral bone loss, ACH was measured. The average loss of bone height was significantly higher in the maxilla and the mandible of *Colla1-Pitx1* mice compared with their WT littermates by 14-fold ($p = 0.0075$) and 8-fold ($p = 0.0002$), respectively (Fig. 3C).

Overexpressed *Pitx1* affects the differentiation of ameloblasts and odontoblasts

Histological analysis of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mouse mandibles and teeth were performed and compared with their WT littermates. Histological data support our previous radiographic findings. Haematoxylin/eosin staining showed altered dental and periodontal anatomy of *Colla1-Pitx1* mice compared with their WT littermates (Figs. 4). The teeth exhibited an irregular root and coronal morphology. The enamel was very thin, with an irregular and undefined pattern. Enamel-free areas were detected (Figs. 4A, 4C). The pulpo-dentin complex of the WT mice consisted of highly differentiated tissues with a consistent morphological pattern that included the dentin, the dentinal tubules, the odontoblast layer, the cell-free zone, and the cell-rich zone. The morphology of the pulpo-dentin complex in the WT mice contrasted with the pulpo-dentin morphology observed in the TG mice. The dentin of the *Colla1-Pitx1* mice exhibited a decrease in the intensity of the Haematoxylin/eosin staining suggesting a decrease in the mineralized matrix content of the radicular and the coronal parts. The dentinal tubules showed an altered form, and this was accompanied by an absence of the predentin space. The odontoblasts of the TG mice, were fewer in number, disorganized, and

appeared to produce an amorphous matrix. Wild space of cell free zone was seen in the pulp of *Colla1-Pitx1* mice. No blood vessels were seen in the pulp (Figs. 4B, 4D). With time, infection tooth can spread to the surrounding periodontium, causing an odontogenic abscess or chronic inflammatory disease. Indeed, some TG mice demonstrate swollen jaws and/or eyelids (Supplemental Figure S1).

Transgenic mice displayed combined periodontal-endodontic lesions

We further examined the periodontium, which consists of gingiva, cementum, periodontal ligament, and the alveolar bone as hypomineralization and enamel attrition may predispose to bacterial invasion and periodontal disease. The periodontium of *Colla1-Pitx1* mice was narrower and revealed a dramatic level of destruction when compared with their WT littermates. Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice revealed a loss in their gingival tissue. Compared with their WT littermates, the teeth of TG mice exhibited extremely thin acellular and cellular cementum layers. Furthermore, a significant alteration was observed in the periodontal ligament structure. The periodontal ligament fibres of the WT mice were well formed and highly structured. They were arranged in parallel with numerous connections to the bone and the cementum. In contrast, the periodontal ligament fibres of the *Colla1-Pitx1* mice were poorly formed and loosely arranged in a nonspecific and irregular manner. The fibres were partially attached to the bone and the cementum. The periodontal ligament had detached from the cementum over a large area. Epithelial rests of Malassez could not be distinguished in the periodontium of TG mice (Figs. 4E-4H). Moreover, severe periodontal signs were characterized by the presence of a periapical abscesses in the *Colla1-Pitx1* mice (Figs. 5A). A striking difference was observed in the alveolar bone thickness of *Colla1-Pitx1*

mice compared with their WT littermates. The coronal and the apical part of the alveolar bone were almost absent while the basal part was approximately five fold less than the size of the alveolar bone of the wild type mice (Fig. 4A, 4C).

Discussion

In this study, we have clearly shown that *Colla1-Pitx1* mice overexpressing *Pitx1* in osteoblast cell lineages, exhibited bone loss at the craniofacial level accompanied with severe dental defects, loss in periodontal attachment, decreased alveolar bone height, tooth loss, and also a high incidence of spontaneous pathological jaw fracture. Indeed, reduction in the bone mass density and the mineral content of the jawbones would set the stage for rapid alveolar crest height loss. With decreased bone density, periodontal disease may occur more rapidly.

Altered mineral properties occur in the bones and teeth of transgenic *Colla1-Pitx1* mice. The mineralized matrices of enamel, cementum, dentin, and bone are similar in their ability to form a microenvironment that facilitates deposition of hydroxyapatite.⁽¹⁶⁾ In parallel studies, we demonstrated that the overexpression of *Pitx1* decreases the number of osteoblasts and these cells have an impaired differentiation capacity (Karam et al., 2015 manuscript submitted). Interestingly, our data have suggested that *Colla1-Pitx1* mice might also exhibit decreased enamel, cementum, and dentin mineralization content with a decreased number of odontoblasts.

Amelogenesis is the physiological process leading to the formation of enamel. It involves a secretory stage followed by a maturation stage, which are separated by a transition zone in the continuously growing mouse incisor teeth.⁽¹⁷⁾ As ameloblast cells transit from the secretory stage to the maturation stage, their morphology and expression profiles change radically. Indeed, gene dysregulation at any stage of amelogenesis can result in a group of hereditary conditions termed *Amelogenesis Imperfecta* (AI) that adversely affects the structure and appearance of enamel.⁽¹⁸⁻²²⁾ Consistently, suggested impaired mineralization and the structure of the teeth leaves the bone more susceptible to bacterial invasion, increasing the risk for periodontitis and tooth loss. Moreover, the molecular mechanisms underlying the control of enamel maturation remain poorly understood. Interestingly, genome-wide analysis of transcriptome profiles during amelogenesis revealed a very dynamic transcriptomic process during enamel maturation.⁽²³⁾ Of note, Lacruz et al (2012) performed a genome-wide transcriptomic analysis to identify the genetic events driving enamel mineralization and reported, among other changes, a significant downregulation in *Pitx1* gene expression by 6.3 to 7.5-fold when the expression profiles of rat ameloblasts at the secretion stage were compared with those of the mature stage.⁽²¹⁾ It is conceivable that overexpression of *Pitx1* in transgenic mice could prevent the transition of secretory ameloblasts to their mature stage.

Our results suggested that the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice might have developed combined endodontic-periodontic lesions caused by either an endo-perio or a perio-endo infection, or a combination of both. Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice displayed striking enamel, dentinal, and cemental defects. Dentin elicits important defense functions aiming to preserve the integrity of the pulp tissue. When these tissues are damaged, the exposed dentinal

tubules serve as pathways to bacteria for entry into the pulp, which provoke inflammation. Oral bacteria invade the pulp causing pulpitis. With persistent infection, acute pulpitis leads to pulp necrosis. Infection from the pulp tissue within the tooth may spread into the bone surrounding the apex of the root, forming a periapical abscess. This infection may then spread through the periodontal ligament to communicate with the margin of the alveolar bone and the oral cavity. On the other hand, the infection from the periodontal tissue may extend via accessory canals into the root canal of the affected tooth causing pulpitis. The absence of Epithelial Rests of Malassez (ERM) could have a drastic effect on the periodontium.⁽²⁴⁾ ERM cells could not be distinguished in the transgenic *Colla1-Pitx1* mice. These cells not only play a major role in maintaining the normal periodontal cellular elements and function but are also significantly involved in periodontal regeneration.⁽²⁵⁾ These epithelial cell islands and cords form a three-dimensional network around the root. They constantly release epithelial or epidermal growth factors that stimulate osteoclastogenesis on the periodontal bone surface thereby promoting the maintenance of periodontal space.⁽²⁶⁾

Women with osteoporosis are three times more likely to experience tooth loss than those who do not have the disease.^(27, 28) The loss of soft tissue attachment and the affected alveolar bone in osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice may result in high susceptibility to bacterial infection, which in turn, leads to tooth loss. Teeth, unlike bones, are usually not resorbed by osteoclasts, because of the presence of protective antiresorption factors residing in the periodontal ligament and in the acellular cementoblast layer for its protection.⁽²⁹⁾ Our data suggested severe external resorption of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice root surface. This defect is

most likely resulting in loss of protection caused by the severe deterioration of the periodontal ligament and the acellular cementum.

In parallel studies, we have shown that the impairment of bone anabolism in the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice results at least, in part, from the inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Karam et al., 2015 manuscript submitted). Genetic studies demonstrated that Wnt/ β -catenin signaling plays an essential role not only in skeletal maturation but also in tooth development.⁽³⁰⁻³⁴⁾ Both osteoporotic and periodontal diseases may share a common pathway where the inactivation of Wnt/ β -catenin signaling is associated with the progression of diseases.⁽³⁵⁾ Furthermore, Wnt signaling has been shown to play an important role in the homeostasis of the periodontal ligament. Depletion of Wnt signaling leads to a pathological widening of the periodontal ligament space accompanied by reduced osteogenic stimuli and disorganized fibrillary matrix.⁽³⁶⁾ Another study suggested that Wnt/ β -catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts, implying a role for Wnt signaling in the mineralization of the tissue.⁽³⁷⁾ In addition, expression of Sclerostin (*SOST*) and Dickkopf-related protein 1 (*DKK1*), which have been shown to be potent inhibitors of Wnt signaling were higher by 4.1- ($p = 0.005$) and 6-fold ($p = 0.0008$), respectively, in the osteoblasts of *Colla1-Pitx1* mice when compared with their WT littermates (Karam et al., 2015 manuscript submitted). Interestingly, *SOST* and *DKK1* were upregulated in the periodontal tissues of chronic periodontitis subjects, suggesting a possible role for these molecules in periodontal tissues.⁽³⁵⁾ It was also observed that the overexpression of *DKK1* in pulp and odontoblast cells caused impaired mandibular molar formation, root resorption, and an altered periodontium.⁽³⁶⁾ On the other hand, pharmacological inhibition of

SOST, using an SOST neutralizing monoclonal antibody, restored the alveolar bone destruction following experimental periodontitis in rats.⁽³⁷⁾ The Wnt signaling pathway stimulates bone formation by stimulating the differentiation of stem and osteoprogenitor cells into osteoblasts.⁽³⁸⁾ Thus, the loss of alveolar bone and cementum could be a foreseeable phenotype in the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice. All these findings raise a number of interesting questions as to the possible regulation of osteoporosis and periodontitis by PITX1 via the Wnt/canonical signaling pathway. Even though we did not directly test the consequence of Wnt perturbation, our data seem to implicate Wnt signaling in the drastic perturbation of oral health in osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice. Taken together, these data suggest that PITX1 plays an active role in mandibular and tooth formation either directly or indirectly through the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

In summary, overexpression of *Pitx1* in osteoblast and odontoblast cells leads to early periodontal breakdown, tooth exfoliation, and the loss of systemic bone mass. The dental aspects of the *Colla1-Pitx1* mouse phenotype may be explained by the extensive oral bone loss affecting both jaws, severe developmental defects involving the enamel, dentin, and cementum, and rapid postnatal wearing of teeth. This was accompanied by defects in the dentin structure shown by a decreased thickness of the predentin zone, abnormalities in the ultrastructure of the dentinal tubules making the teeth more susceptible to bacterial invasion, and a breakdown of the periodontal-endodontic structure. Patients with long-standing osteoporosis have increased severity of periodontal disease, including tooth loss. Further clinical validations will be required to determine whether *Pitx1* overexpression occurs in osteoporotic patients affected with severe periodontal disease.

Acknowledgements: We thank the Center for Bone and Periodontal research of McGill University for the three-point bending tests. Dr. Smitha S. Dutt participated in the writing and technical editing of the manuscript.

Authors' role: Study design: N K, A M;

Study conduct: N K; Data collection: N K;

Data analysis: N K, G L, A M;

Data interpretation: N K, G L, and A M,

Drafting manuscript: all authors, N K, and A M take responsibility for the integrity of the data analysis

Conflicts of interest: All authors report no conflicts of interest.

References

1. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993;94(6):646-50.
2. von Wewern N, Klausen B, Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *Journal of periodontology.* 1994;65(12):1134-8.
3. Hildebolt CF. Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofacial Radiology.* 1997;26(1):3-15.
4. Kaye EK. Bone health and oral health. *Journal of the American Dental Association* (1939). 2007;138(5):616-9.
5. Devlin H, Horner K. Diagnosis of osteoporosis in oral health care. *Journal of oral rehabilitation.* 2008;35(2):152-7.
6. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet.* 2005;366(9499):1809-20.
7. Fox CH. New considerations in the prevalence of periodontal disease. *Current opinion in dentistry.* 1992;2:5-11.
8. Mitsiadis TA, Graf D. Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews.* 2009;87(3):199-211.
9. Eleftheriou F, Yang X. Genetic mouse models for bone studies--strengths and limitations. *Bone.* 2011;49(6):1242-54.
10. Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B. Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *The Journal of cell biology.* 1995;129(5):1421-32.
11. Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G. Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 2002;224(2):245-51.
12. Braut A, Kalajzic I, Kalajzic Z, Rowe DW, Kollar EJ, Mina M. Colla1-GFP transgene expression in developing incisors. *Connective tissue research.* 2002;43(2-3):216- 9.

13. Marijanovic I, Jiang X, Kronenberg MS, Stover ML, Erceg I, Lichtler AC, et al. Dual reporter transgene driven by 2.3Colla1 promoter is active in differentiated osteoblasts. *Croatian medical journal*. 2003;44(4):412-7.
14. Robey PG. Vertebrate Mineralized Matrix Proteins: Structure and Function. *Connective Tissue Research*. 1996;35(1-4):131-6.
15. A N. Ten Cate's Oral Histology Development, Structure and Function. 2008.
16. Gadhia K, McDonald S, Arkutu N, Malik K. Amelogenesis imperfecta: an introduction. *British dental journal*. 2012;212(8):377-9.
17. Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells, tissues, organs*. 2007;186(1):78-85.
18. Stephanopoulos G, Garefalaki ME, Lyroudia K. Genes and related proteins involved in amelogenesis imperfecta. *Journal of dental research*. 2005;84(12):1117-26.
19. Wright JT. The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *American journal of medical genetics Part A*. 2006;140(23):2547-55.
20. Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, et al. Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells, tissues, organs*. 2011;194(2-4):279-83.
21. Lacruz RS, Smith CE, Bringas P, Jr., Chen YB, Smith SM, Snead ML, et al. Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(5):2264-75.
22. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, et al. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microscopy Research and Technique*. 2003;60(5):491-502.
23. Xiong J, Gronthos S, Bartold PM. Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontology 2000*. 2013;63(1):217-33.
24. Xiong J, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Epithelial cell rests of Malassez contain unique stem cell populations capable of undergoing epithelial-mesenchymal transition. *Stem cells and development*. 2012;21(11):2012-25.
25. Daniell HW. Postmenopausal tooth loss. Contributions to edentulism by osteoporosis and cigarette smoking. *Arch Intern Med*. 1983;143(9):1678-82.

26. Groen JJ, Menczel J, Shapiro S. Chronic destructive periodontal disease in patients with presenile osteoporosis. *Journal of periodontology*. 1968;39(1):19-23.
27. Andreasen JO, Andreasen FM. Root resorption following traumatic dental injuries. *Proceedings of the Finnish Dental Society Suomen Hammaslaakariseuran toimituksia*. 1992;88 Suppl 1:95-114.
28. Zhang R, Yang G, Wu X, Xie J, Yang X, Li T. Disruption of Wnt/beta-catenin signaling in odontoblasts and cementoblasts arrests tooth root development in postnatal mouse teeth. *International journal of biological sciences*. 2013;9(3):228-36.
29. Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1*(-/-) mice. *Genes & development*. 2002;16(24):3173-85.
30. Sasaki T, Ito Y, Xu X, Han J, Bringas P, Jr., Maeda T, et al. LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. *Developmental biology*. 2005;278(1):130-43.
31. Jarvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, Thesleff I. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(49):18627-32.
32. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1202-9.
33. Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, Demasi AP, et al. Involvement of the Wnt-beta-catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf- related protein 1, in chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(6):550-7.
34. Lim WH, Liu B, Cheng D, Williams BO, Mah SJ, Helms JA. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Journal of periodontal research*. 2014.
35. Heo JS, Lee SY, Lee JC. Wnt/beta-catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts. *Molecules and cells*. 2010;30(5):449-54.

36. HAN, #160, L. X, LIU, #160, M., et al. Post-natal Effect of Overexpressed DKK1 on Mandibular Molar Formation. Washington, DC, ETATS-UNIS: International Association for Dental Research; 2011. 6 p.
37. Taut AD, Jin Q, Chung JH, Galindo-Moreno P, Yi ES, Sugai JV, et al. Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2013;28(11):2347-56.
38. Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, Baker JJ, Carpenter AC, Rao S, et al. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109(33):E2197-204.

Figure Legends

Fig. 1 Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice display striking teeth defects. (A) Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice exhibit severe malocclusion. (B) Photos of the maxilla teeth. Hypocalcification and hypoplasia of the molars. Loss of the contact point indicated by black dots and migration of the molars indicated by black arrow of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice in the buccal direction.

Fig. 2 Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice exhibit decreased jawbone density. (A) View of severe malocclusion, mental-parietal radiography showing cephalometric variables; Oc, posterior apex of the external occipital crest; Midline, the perpendicular bisector for the line segment between left and right; Mx, contact point of the left and right maxillary incisors; Mn, contact point of the left and right mandibular incisors in the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice skulls. (B) X-ray examination of the jawbone density of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice. (C, D) Total BMD (g/cm^2) and BMC (grams) of both mandibles of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice and their wild type littermates. (E) Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice exhibit spontaneous mandibular fracture. X-ray showing a fracture callus indicated by red arrow (F) Three-point bending test quantitation (Stiffness). (G) Three-point bending test quantitation (Work to Ultimate Point). Data are presented as mean \pm SD for 12 mice from each genotype. Asterisks indicate statistically significant difference (* $p < .05$; *** $p < .0005$; **** $p < .00005$).

Fig. 3 Osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice exhibit dental and periodontal defects accompanied by teeth loss. (A) X-ray examination reveals loss of one molar (indicated by red arrow) in the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice. (B) X-ray examination of the dental and periodontal aspects of the osteoporotic *Colla1-Pitx1* mice. (C) Average fold change in alveolar crest height (ACH) represented by the distance from the cemento-enamel junction (CEJ) to the top of the alveolar bone crest adjacent to the tooth (ABC). Data are presented as mean \pm SD for 12 mice from each genotype. Asterisks indicate statistically significant difference (*** $p < .0005$; ***** $p < .000005$).

Fig. 4 Staining with hematoxylin and eosin shows dental and periodontal defects in osteoporotic *Collα1-Pitx1* teeth. (A,C) The alveolar bone consists of the basal body (B), apical part (A), and the coronal part (Cr). (B,D, E, H) The pulpodentin complex consists of dentin (D) dentinal tubules (Dt), the odontoblast layer (Od), the cell free zone (zone of Weil; CF), and the cell rich zone (CR). The periodontium consists of gingivae (G), dental cementum (C), periodontal ligament (PDL), and alveolar bone (AB).

Fig. 5 Hematoxylin and eosin staining shows root resorption. (A) PA, periapical abscesses. (A, B) Black arrows show root resorption.

Figures

Figure 1: Osteoporotic *Col1a1-Pitx1* mice display striking teeth defects

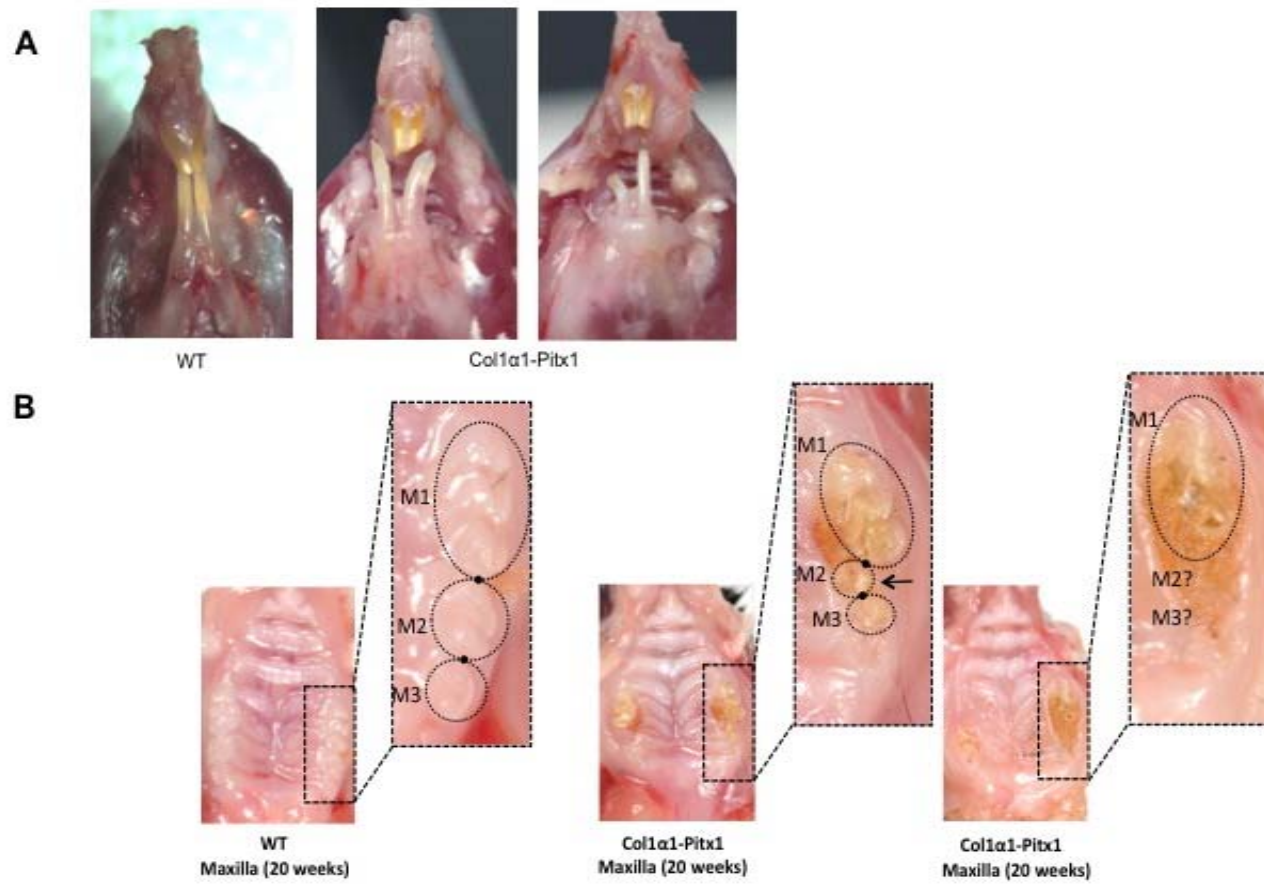


Figure 2: Osteoporotic *Col1 α 1-Pitx1* mice exhibit decreased jawbone density

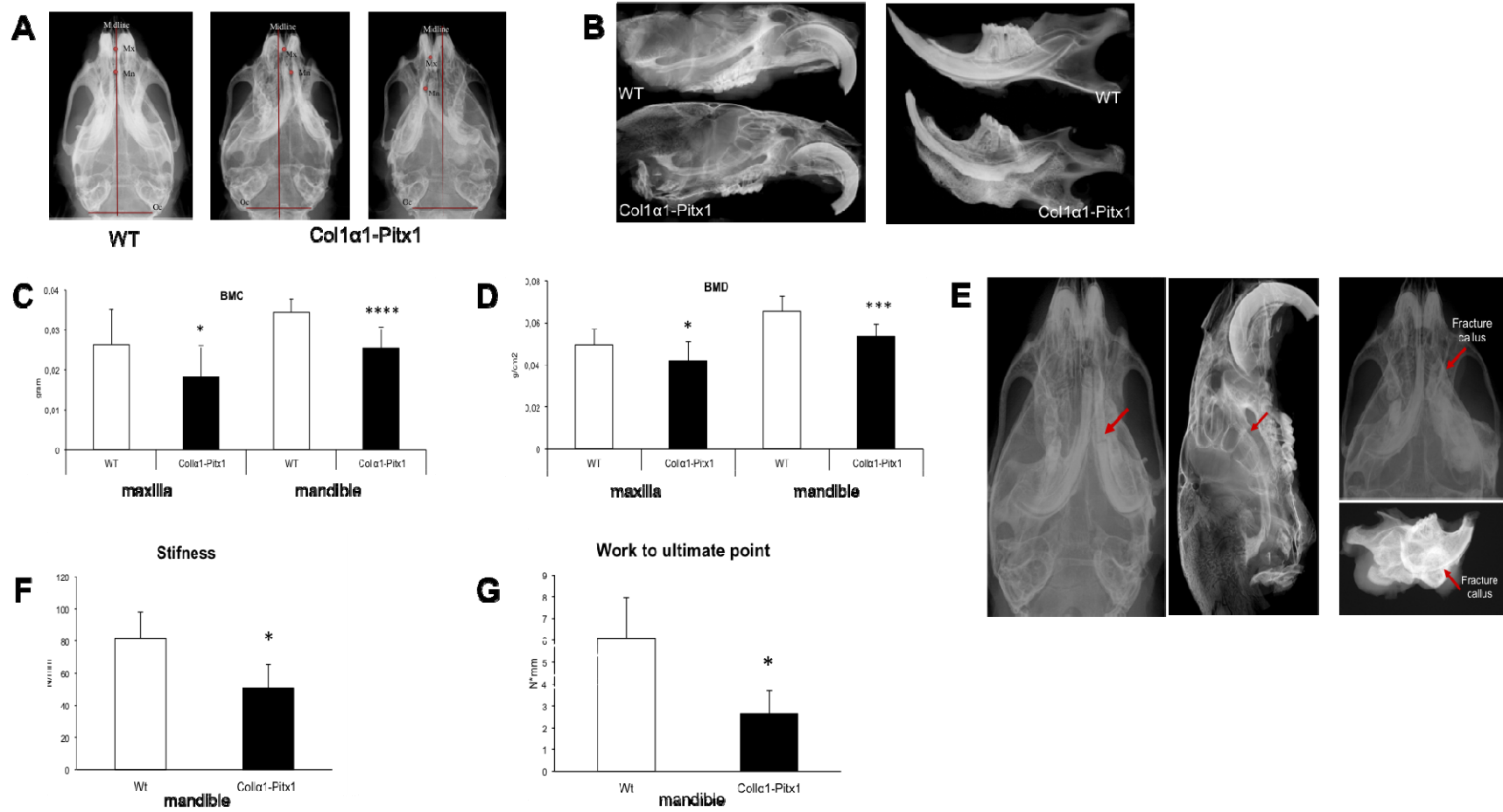


Figure 3: Osteoporotic *Col1a1-Pitx1* mice exhibit dental and periodontal defects accompanied with teeth loss phenotype

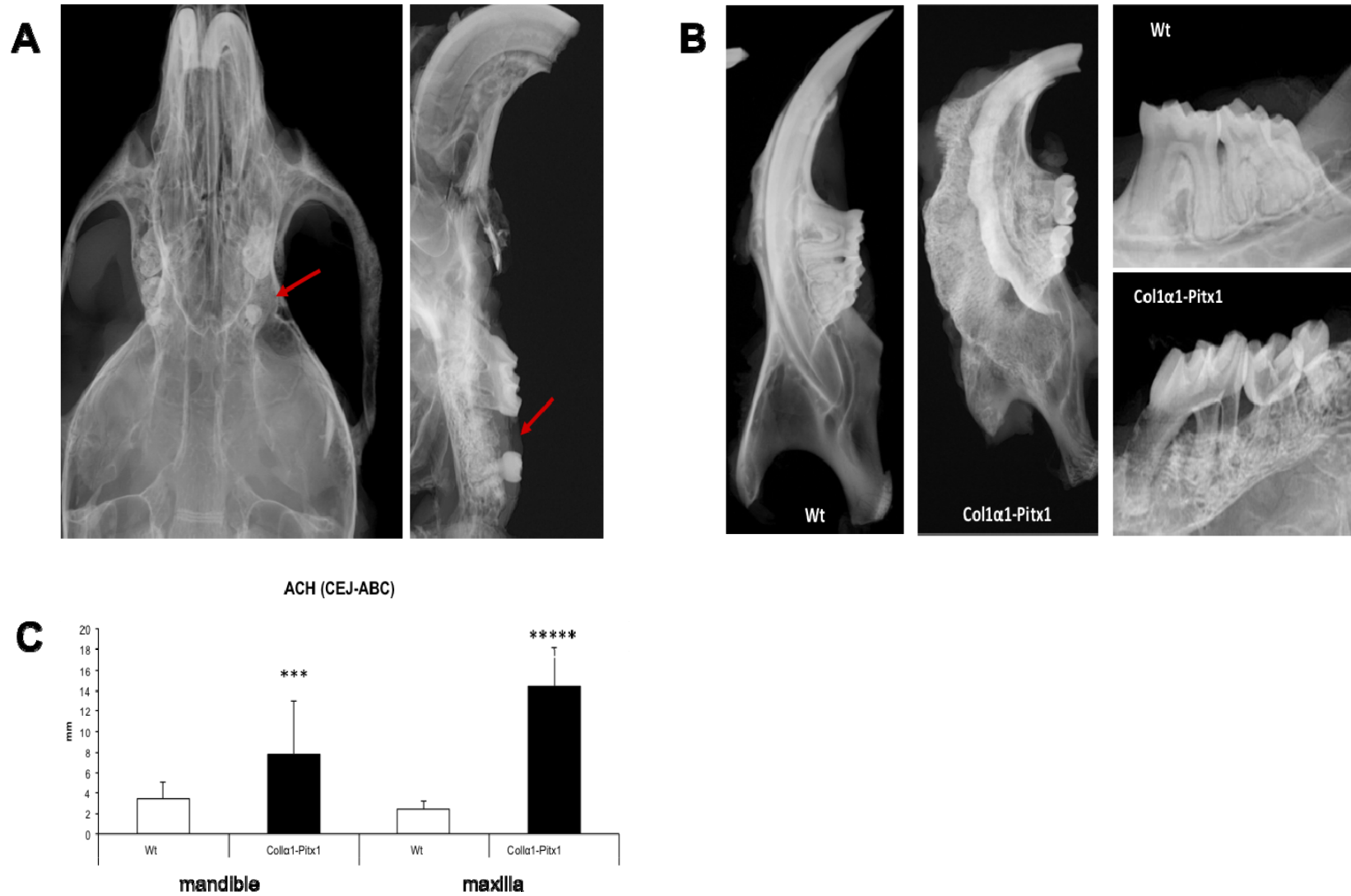


Figure 4: Staining with hematoxylin and eosin shows dental and periodontal defects in osteoporotic *Col1 α 1-Pitx1* teeth

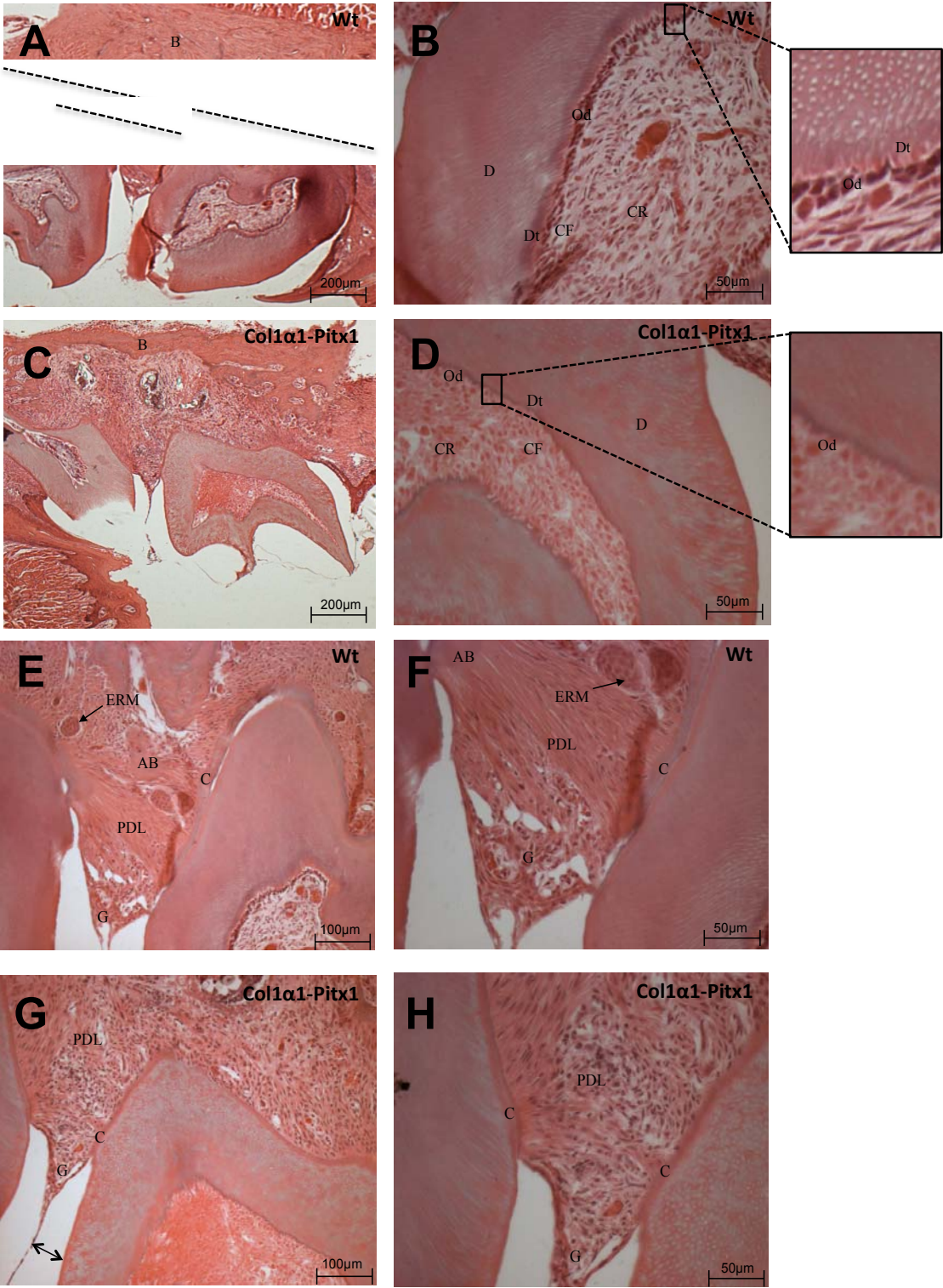
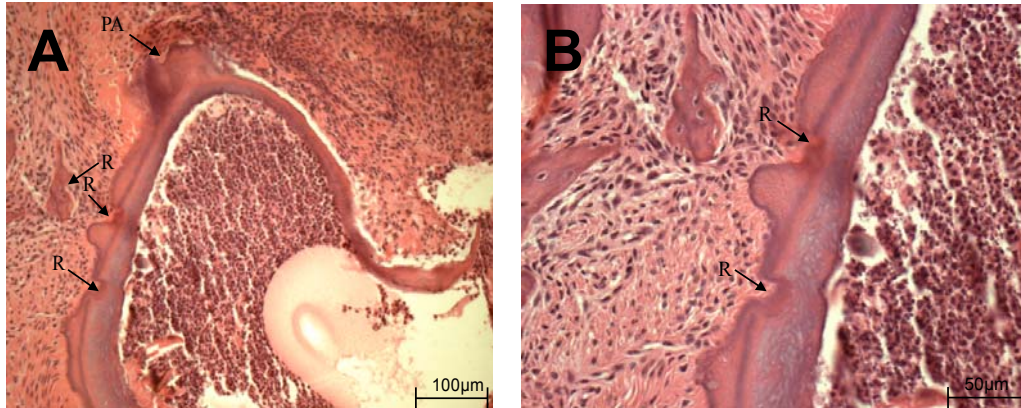
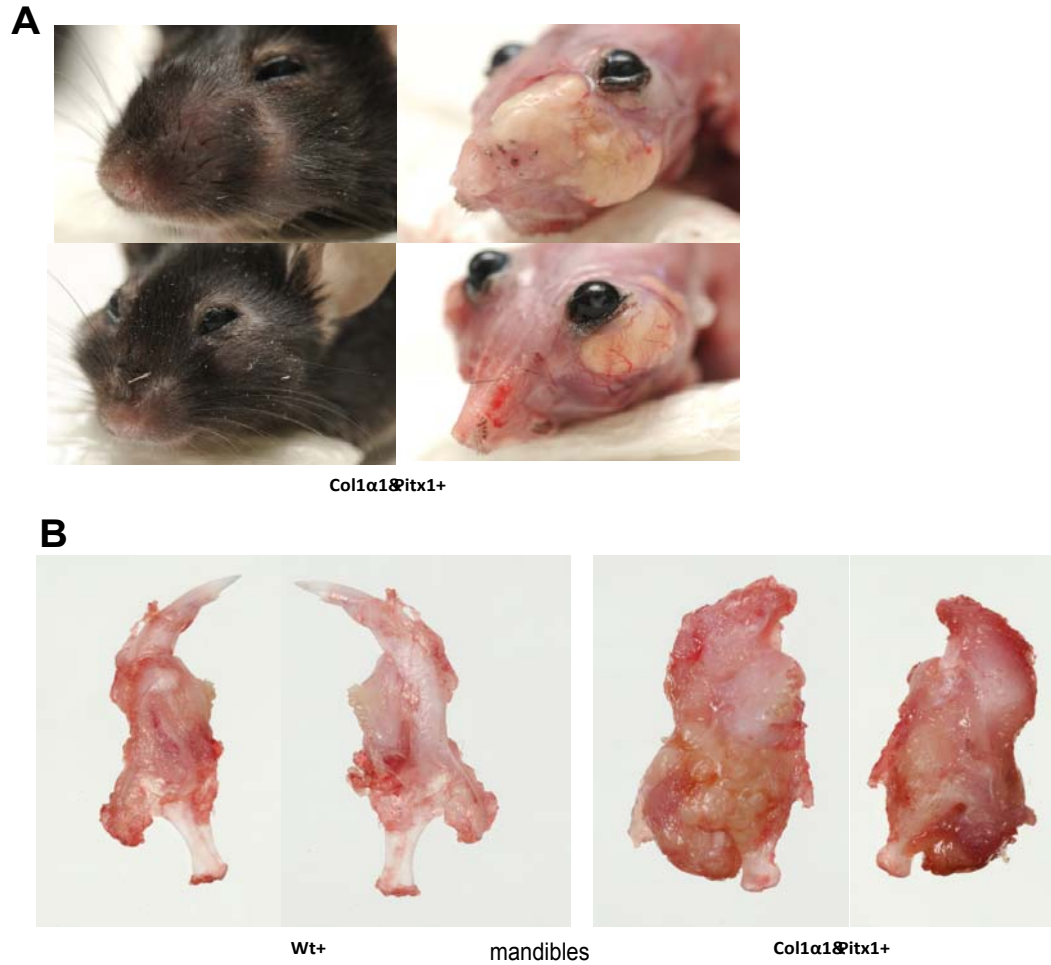


Figure 5: Hematoxylin and eosin staining shows root resorption in osteoporotic *Colla1-Pitx1* teeth. (A) PA, periapical abscesses. (A, B) Black arrows show root resorption



Supplemental Figures

Supplemental Figure 1. Swollen mandibles and/or eyelids were detected in some of the osteoporotic *Col1a1-Pitx1* mice.



Chapitre 4: Discussion

Plusieurs lignées de souris transgéniques *Colla1-Pitx1* ont été créées, ces lignées présentant un phénotype osseux et dentaire claire. Dans le contexte de cette thèse nous avons caractérisé le phénotype de la lignée 30 qui surexprime 32 fois le gène *Pitx1*. Notre travail a mis en évidence une inhibition de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* surexprimant le facteur de transcription PITX1 au niveau des ostéoblastes. En effet, l'expression de SOST et DKK1, (deux puissant inhibiteurs de la voie de signalisation Wnt) ainsi que GSK3- β (une enzyme qui phosphoryle la β -caténine dans le cytoplasme) est augmentée de 4,1, 6 et 5,4 fois respectivement dans les ostéoblastes provenant des fémurs des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* par rapport aux souris non-transgéniques.

En outre, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine par des traitements au chlorure de lithium (LiCl), un activateur de cette voie, induit une augmentation de la masse osseuse trabéculaire chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*, sauvant ainsi en partie le phénotype ostéoporotique induit par la surexpression de *Pitx1*. En effet, l'os cortical n'a pas été significativement amélioré suite au traitement avec le lithium et cela pourra être due au fait que le renouvellement global du squelette est plus rapide pour l'os trabéculaire (25% par an), que pour l'os cortical (3 à 4% par an). De plus, la diminution de l'épaisseur de l'os cortical d'une part et l'augmentation de sa porosité d'autre part chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* suggère une augmentation de l'ostéoclastogenèse à ce niveau. Toutefois, une étude récente a démontré que l'administration de lithium chez les souris, augmente l'ostéoblastogenèse sans avoir un effet sur l'ostéoclastogenèse (140). En effet, il a été démontré que l'administration de lithium chez les souris favorise la formation osseuse causée par une augmentation significative du nombre d'ostéoblastes et de l'épaisseur des ostéoïdes. En plus, elle améliore la masse osseuse trabéculaire en augmentant le pourcentage osseux (BV/TV), le nombre de travées (Tb.N) et leurs épaisseurs (Tb.Th). Cependant, cette étude a démontré que l'administration de lithium n'avait aucun effet sur l'os cortical (140). En plus, une étude effectuée chez l'humain, a montré que le lithium induit la différenciation ostéoblastique des cellules souches

mésenchymateuses en augmentant l'expression des gènes impliqués dans l'ostéoblastogenèse (143).

Ceci pourrait expliquer partiellement pourquoi l'os cortical des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* n'a pas été amélioré suite à l'administration de lithium. D'autres expériences seront nécessaires afin d'étudier l'effet du lithium au niveau cellulaire chez les souris. Cependant, ces résultats appuient l'hypothèse voulant que PITX1 contrôle la masse osseuse, au moins en partie, *via* la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.

Sommes toutes, ces données montrent que la modulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine apparaît une voie de recherche prometteuse pour augmenter la formation osseuse.

D'autre part, le rôle de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le développement des maladies parodontales a été mis en évidence chez les souris *Colla1-Pitx1*. En effet, la sur-expression de SOST et de DKK1 chez ces souris pourrait expliquer en partie ce phénotype car une étude récente a montré que SOST et DKK1 sont surexprimés dans les tissus parodontaux de sujets présentant une parodontite chronique, suggérant un rôle potentiel de ces molécules dans le développement de la maladie parodontale (236). En plus, la voie de signalisation Wnt stimule la formation osseuse en stimulant la différenciation de cellules souches en ostéoblastes (338). Ainsi, la perte de l'os alvéolaire et du ciment serait un phénotype prévisible engendré par l'inactivation de la voie Wnt chez les souris ostéoporotiques *Colla1-Pitx1*.

En effet, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est une voie complexe mais fondamentale dans le développement embryonnaire et notamment dans la néoformation des os, des dents, et du parodonte.

Plusieurs approches génétiques et pharmacologiques montrent que cette voie régule les développements osseux par différents mécanismes à différentes étapes de vie comme discuté dans la section 1.11 et 1.12.

Cette voie joue également un rôle essentiel durant plusieurs étapes de la morphogenèse dentaire. D'ailleurs, l'inactivation de la β -caténine durant le développement des dents dans les odontoblastes (cellules responsables de la formation de

la dentine) et les cémentoblastes (cellules responsables de la formation du ciment) induit la formation de molaires déracinées ainsi que des incisives incomplètes où la dentine et le tissu parodontale sont sévèrement affectés (276). D'autre part, une mutation au niveau de la β -caténine, qui induit l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine au niveau de l'épithélium buccal, provoque la formation de grands bourgeons dentaires difformes et une augmentation de l'expression des régulateurs de la morphogénèse dentaires. Inversement, une surexpression de DKK1, qui induit l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine au niveau des cellules épithéliales et mésenchymateuses dentaire, bloque la formation des dents et induit une diminution de l'expression des régulateurs morphogénétiques clés (277). Appuyant ce rôle, une autre étude indépendante a montré que l'inhibition de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en surexprimant DKK1 bloque la formation des dents (278). En plus, l'inactivation ciblée de l'activateur lymphoïde factor-1 (LEF1), un médiateur nucléaire de la signalisation Wnt, entraîne un arrêt de développement de la dent (279). Supportant l'implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans la morphogénèse dentaire, plusieurs gènes appartenant à la famille de Wnt, ont été détectés dans l'épithélium et le mésenchyme dentaire (280). En outre, au cours du développement des dents, la β -caténine a été observée à la fois dans l'épithélium et dans le mésenchyme dentaire sous-jacent (277). En contrepartie, une surexpression de la β -caténine au niveau de l'épithélium dentaire induit la formation de dents surnuméraires (281).

Plusieurs études ont souligné l'importance de la voie de signalisation Wnt canonique dans l'homéostasie du ligament parodontal. En effet, l'inactivation de cette voie chez les souris conduit à un élargissement pathologique de l'espace ligamentaire accompagné d'une désorganisation de la matrice et d'une réduction de l'expression des gènes ostéogéniques entraînant un amincissement de l'os alvéolaire (282). Ajouté à cela, une surexpression de DKK1 dans la pulpe dentaire et les odontoblastes des souris provoque une altération dans la formation des molaires, une résorption des racines et une altération du parodonte (337). En contrepartie, une inhibition de SOST, en utilisant un anticorps neutralisant, prévient la destruction de l'os alvéolaire causée par une parodontite expérimentale chez le rat en activant la formation osseuse et la minéralisation au niveau de l'os corticale et trabéculaire de la mâchoire ainsi qu'en augmentant la largeur du

cément (211). Appuyant ce rôle, une autre étude indépendante a montré que chez des souris qui développent une parodontite la délétion du gène SOST ou le blocage de sa fonction, en utilisant un anticorps contre la SOST, restaure significativement l'os alvéolaire et le ligament parodontal (283). D'ailleurs, les souris dépourvues du gène SOST ont révélé une augmentation de la dimension de l'os alvéolaire (basale, coronaire et apicale) ainsi qu'une augmentation de la largeur du cément (284).

Sommes toutes, la surexpression de *Pitx1* induit des malformations au niveau des os, des dents, et du parodonte chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* en inhibant la voie Wnt/ β -caténine, notamment via la production accrue de DKK-1 et SOST. En effet, ces dernières années, plusieurs études ont démontré l'implication de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le développement de l'ostéoporose et les maladies parodontales (276, 281, 285-287). Cependant, aucune étude n'a établie qu'elle était le lien entre ces deux maladies. Toutefois, nos résultats ont montré le rôle potentiel de PITX1 dans l'induction de l'ostéoporose et des maladies parodontales en inhibant l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Bien qu'il a été montré que PITX1 interagit avec DVL3, gène associé à la voie Wnt/ β -caténine, aucune association directe a été établie entre *Pitx1* et la voie Wnt/ β -caténine auparavant (106). Cependant, plusieurs études récentes ont établi une relation entre PITX2, un autre membre de la famille PITX, et la voie Wnt/ β -caténine (288-290). En dépit d'être une cible de la voie de signalisation Wnt canonique, PITX2 peut se fixer sur le promoteur de *Wnt2* induisant l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules d'adénocarcinome ovarien humain. D'autre part, la surexpression de *Pitx2* induit la diminution de l'expression des récepteurs de Wnt (FZD2/3 et LRP5/6) afin de limiter l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (289). En effet, bien que PITX1 et PITX2 se lient à la même séquence consensus, ils ne partagent pas le même domaine d'interaction protéine-protéine, ce qui entraîne une activation ou une répression de la transcription dépendamment de leurs partenaires de liaison.

La surexpression du gène *Pitx1* au niveau des os entraîne une diminution de la formation et de la minéralisation osseuse

La surexpression de *Pitx1* induit une diminution de la densité et de la minéralisation des os, des mandibules et des dents phénomènes présents chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*. En effet, dans le cadre du premier article présenté précédemment, nous avons détecté une différence significative de la densité osseuse totale en comparant des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* aux souris non-transgéniques. Toutefois, nos données montrent que contrairement aux femelles, les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* mâles se rattrapent avec leurs congénères de type sauvage après 20 semaines. Ce rattrapage pourrait être attribuée à la diminution de l'expression du gène de collagène de type I à partir de l'âge de 20 semaines chez la souris (291). La différence entre les deux sexes pourrait être expliquée par le fait que les femmes sont plus susceptibles de développer l'ostéoporose que les hommes (292). En général, l'incidence de l'ostéoporose chez l'homme est faible en raison d'une plus grande masse osseuse, de la taille de l'os et de l'absence d'une ménopause masculine équivalente (293). Une autre explication possible de cette différence entre les sexes pourrait aussi être la diaphonie entre la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et les hormones stéroïdes sexuelles. Il a précédemment été démontré que les femmes après la ménopause présentent une augmentation de leur niveau de SOST sérique. Ce niveau était inversement associé à l'indice de l'estradiol circulant (294). En revanche, après le traitement avec de l'oestrogène, les femmes ménopausées ont montré une diminution significative du niveau de SOST (295). Ces résultats suggèrent que l'oestrogène inhibe directement l'expression de SOST. La diminution du niveau d'oestrogène avec l'âge chez les souris femelles pourrait expliquer en partie pourquoi les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* femelles ne se rattrapent pas avec leurs congénères de type sauvage après la diminution de l'expression du gène collagène de type 1.

La diminution significative de la densité osseuse et du contenu en minéraux accompagnée d'une incidence de fracture spontanée chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* sont des phénotypes similaires à ceux trouvés chez les patients

ostéoporotiques. Bien que, les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* soient de jeunes adultes (2-3 mois, ce qui représente approximativement des adultes de 25 ans chez l'humain), elles présentent des phénotypes d'ostéoporose primaire associée au vieillissement. Un des mécanismes possible pour expliquer ce phénomène pourrait découler du rôle de PITX1 dans l'inhibition de l'expression du gène *Tert* codant pour la télomérase reverse transcriptase (263). En effet, les télomères placés à l'extrémité des chromosomes, sont de courtes séquences d'ADN répétées plusieurs milliers de fois. Elles prolongent les chromosomes et leur assurent une protection contre les effets du temps et de l'environnement. En effet, les télomères raccourcissent à chaque tour de réplication entraînant le vieillissement des cellules. Sans l'action des télomérases qui remettent la partie perdue à chaque division cellulaire, au bout d'une quarantaine de divisions, le chromosome perdrait les informations de ses derniers gènes entraînant ainsi une mort programmée de la cellule par apoptose (296). Ainsi, une inhibition potentielle de TERT chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* peut être la raison du vieillissement prématuré de leurs cellules. D'ailleurs, chez les poissons zèbres, la perte de la télomérase entraîne un phénomène de dégénérescence prématurée de nombreux tissus et une diminution de la durée de vie, associés au raccourcissement des télomères (297). D'autre part, les souris mTERT-/- présentent un raccourcissement de leur télomères qui se manifeste par une diminution de la capacité de leur cellules à se renouveler (298). En outre, chez l'Homme des mutations dans les gènes des sous-unités de la télomérase ou des protéines télomériques sont à l'origine de syndromes de vieillissement prématuré accompagné d'un raccourcissement des télomères, et la taille des télomères est un indicateur de la sévérité de la maladie (299). C'est le cas notamment des patients atteints de dyskératose congénitale ou du syndrome de Werner, qui présentent un vieillissement prématuré et une prédisposition aux cancers. Fait intéressant, ces patients sont également atteints d'ostéoporose (300, 301).

L'analyse des tests de tomодensitométrie effectués sur les fémurs des souris transgénique *Colla1-Pitx1* a montré une altération de la microarchitecture osseuse caractérisée par un amincissement de 59%, une augmentation de 84.3% de la porosité et une diminution de 6.8% du volume osseux de l'os cortical lorsque comparé aux souris non-transgéniques. Cette altération a été accompagné par une diminution significative de

20.9% de l'épaisseur et de 32.9% de la connectivité de l'os trabéculaire lorsque comparé aux souris non-transgéniques. La microarchitecture de l'os corticale était plus affectée que celle de l'os trabéculaire. À noter que, au niveau du col du fémur l'os cortical prédomine avec seulement 25% d'os trabéculaire ce qui élucide l'importance de l'os cortical (302). La géométrie de l'os cortical détermine en grande partie la rigidité des os cela explique la baisse importante de 33.4 % de la résistance biomécanique chez les souris *Colla1-Pitx1* par rapport à leurs congénères.

En effet, nos deux manuscrits montrent que l'émail, le ciment, la dentine et les os (mandibules et fémurs) des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* ont un phénotype cellulaire altéré et leur matrice extracellulaire est sous-minéralisée comparativement aux souris non-transgéniques. La rigidité des os est principalement due à sa minéralisation. D'ailleurs, une bonne minéralisation osseuse est caractérisée par la formation de cristaux d'hydroxyapatite de calcium qui se situent sur et entre les fibres de collagènes. Les matrices minéralisées de l'émail, du ciment, de la dentine et des os sont semblables dans leur capacité à former un micro-environnement qui facilite le dépôt de cristaux hydroxyapatite (290). Cependant, l'activité des gènes contrôlant l'ostéoblastogenèse, l'odontoblastogenèse et la cimentoblastogenèse peut partager une voie commune. Pour cela, une diminution de la minéralisation de l'émail, du ciment, de la dentine et des os pourrait être le résultat d'une altération d'une voie commune, entraînée par la surexpression de *Pitx1*.

Fait intéressant, la mandibule subit une ossification intramembranaire à l'opposé des membres postérieurs qui subissent une ossification endochondrale. Cependant, chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* les deux mécanismes d'ossification sont affectés.

En effet, une surexpression de *Pitx1* induit une diminution de la densité et de la masse osseuse corticale et trabéculaire, ainsi qu'une augmentation de la fragilité des os, un phénotype similaire à celui de l'ostéoporose. Toutefois, l'inactivation partielle de PITX1 induit une augmentation de la masse osseuse de l'os corticale et de l'os trabéculaire, ainsi qu'une calcification marquée du cartilage, symptômes apparentés aux stades précoces de l'arthrose (247). Depuis de nombreuses années, une relation inverse entre les deux maladies a été évoqué (305). En effet, il est rare de retrouver chez une même personne ces deux pathologies, alors qu'il s'agit de deux conditions fréquentes.

Cette relation inverse pourrait être expliquée par l'effet inverse de PITX1 sur le remodelage osseux dans chacune des deux maladies. Toutefois, les mécanismes physiopathologiques de l'arthrose et de l'ostéoporose sont très proches et font intervenir des facteurs génétiques souvent communs, tels que les polymorphismes de nombreux gènes appartenant à la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (LRP5, FRZB et WNT) qui agit d'une façon inverse dans chacune des deux maladies (306). D'ailleurs, le blocage de la voie de la Wnt/ β -caténine a déjà été proposé comme traitement potentiel pour réduire la sévérité de l'arthrose (307). Inversement, il est proposé que l'activation de cette voie de signalisation pourrait augmenter la formation osseuse et réduire la sévérité de l'ostéoporose tel que discutée dans la section 1.11.1. D'autre part, il a été démontré que la SOST inhibe la minéralisation en bloquant ou de retardant la différenciation des ostéoblastes et des pré-ostéocytes en ostéocytes matures (303). En plus, une autre étude indépendante a démontré que des concentrations élevées de SOST inhibent l'alkaline phosphatase chez les souris (304).

La surexpression du gène *Pitx1* induit une diminution de la différenciation cellulaire des cellules mésenchymateuse

Les cellules mésenchymateuse (MSCs) peuvent se différencier en ostéoblastes, en adipocytes ou en chondrocytes. Une réduction de la capacité des MSCs provenant des fémurs de souris transgéniques *Colla1-Pitx1* de se différencier a été constatée.

En effet, l'analyse *in vitro* de la fréquence des MSCs provenant des fémurs des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* a montré une réduction significative de 48.8% du nombre de colonies formées (CFU) comparé aux MSCs provenant des fémurs des souris non-transgéniques. Ceci pourrait expliquer en partie la diminution observée du nombre d'ostéoblastes, d'adipocytes chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*. Ce résultat suggère fortement une perte au niveau des propriétés des MSCs qui pourrait s'expliquer par une diminution de leur capacité à se répliquer, une fonctionnalité altérée et/ou une détérioration de leur potentiel de différenciation. Un des mécanismes possible pour expliquer ce phénomène pourrait découler du rôle de PITX1 dans l'inhibition de l'expression du gène *Tert* codant pour la télomerase reverse transcriptase. En effet, la

surexpression de *Pitx1* chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* pourrait conduire à l'inactivation quasi complète du gène *Tert* (263). D'ailleurs, le niveau d'activité cellulaire de la télomérase est augmenté dans les cellules qui se divisent rapidement tel que les cellules souches (308). Sa synthèse est dépendante du gène *Tert*, ce dernier est responsable des propriétés d'auto-renouvellement de ces cellules. En effet, son rôle est d'allonger leur télomères afin d'augmenter leur durée de vie et leur capacité à se répliquer. L'inhibition potentielle de TERT chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* pourrait expliquer la diminution significative du nombre de colonies formées. D'ailleurs, il est plausible que la génération d'un nombre suffisant de CFU nécessaires à la formation d'os dépend de la capacité des cellules souches à proliférer, et que cette capacité devient limitée en absence des télomérases qui limitent le raccourcissement des télomères

D'autre part, PITX1 pourrait agir à travers une ou plusieurs autres voies de signalisation afin de réguler la capacité des MSCs à se différencier. Notons qu'il a récemment été montré que la β -caténine agit à travers les membres de la famille PITX (PITX2 et PITX3) pour régler la différenciation de plusieurs lignées mésenchymateuses du poumon (309). En plus, il a été démontré que SOST inhibe la prolifération et la différenciation des cellules MSCs humaines (304).

La surexpression de *Pitx1* inhibe l'ostéoblastogenèse, l'odontoblastogenèse et la cémentoblastogenèse via l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine

Une réduction de la capacité des cellules mésenchymateuse (MSCs) à se différencier en ostéoblastes provenant des fémurs de souris transgéniques *Colla1-Pitx1* a été constatée par une réduction de la vitesse de minéralisation associée à une réduction de l'activité enzymatique en ALP et une diminution significative du profil d'expression des marqueurs de différenciations ostéoblastiques (Runx2, Osx, Alp, OCN et OPN). En effet, Runx2 et Osx sont les deux principaux facteurs induisant les cellules souches à se différencier en ostéoblastes. L'altération de la capacité des MSCs à se différencier en

ostéoblastes induit la diminution de l'ostéoblastogenèse induisant un phénotype similaire à l'ostéoporose.

Le principal système contrôlant l'ostéoblastogenèse est la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Cette voie est bien connue pour son rôle important dans la prolifération et la différenciation de divers types cellulaires (310). En effet, la β -caténine a été montrée essentielle pour déterminer le destin des MSCs. L'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine conduit à une augmentation de la différenciation ostéoblastique et une suppression de la chondrogenèse. Inversement, l'inactivation génétique de la β -caténine, provoque une augmentation de la chondrogenèse au détriment de la différenciation ostéoblastique durant l'ossification membranaire et endochondrale. D'ailleurs, au cours du développement embryonnaire, la β -caténine est augmentée dans les ostéoblastes différenciés appuyant le rôle important de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans la différenciation ostéoblastique (311). Plusieurs sources de données soutiennent l'hypothèse que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine stimule la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. En effet, la stimulation de la signalisation Wnt/ β -caténine en utilisant des formes actives de la β -caténine induit l'activité de l'ALP et la minéralisation des ostéoblastes en culture (312). En outre, la SOST exprimée au stade tardif de différenciation par les ostéocytes régule le remodelage osseux en agissant sur la prolifération et la différenciation des pré-ostéoblastes (313).

D'autre part, l'évaluation de la santé bucco-dentaire des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* révèle une diminution significative du nombre d'odontoblastes et des cémentoblastes comparés aux souris non-transgéniques. En effet, l'inactivation de la β -caténine, inhibe l'expression de la dentine sialophosphoprotéine (DSPP), molécule clé responsable de la minéralisation de la dentine. En plus, l'inactivation de la β -caténine, inhibe l'expression de l'OCN et de la sialoprotéine osseuse (BSP) justifiant la formation perturbée des odontoblastes et des cémentoblastes (276). D'autre part, Yamashiro et al. ont rapporté que Wnt10a, un membre de la voie de signalisation Wnt canonique, est spécifiquement associée à la différenciation des odontoblastes, de même que l'expression forcée de Wnt10a induit l'expression de la dentine sialophosphoprotéine (DSPP), molécule clé responsable de la minéralisation de la dentine, montrant l'implication potentielle de Wnt10a dans la minéralisation de la dentine (314).

D'autre part, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine inhibe la différenciation des cémentoblastes via la régulation de l'expression des facteurs de transcription sélectifs. En effet, les cémentoblastes partagent des caractéristiques phénotypiques avec les ostéoblastes en termes de l'expression des gènes ostéogéniques. D'ailleurs, il a été rapporté que, dans des cellules provenant de la papille interdentaire, Wnt3a, un autre membre de la voie de signalisation Wnt canonique, induit l'expression du marqueur ostéo/odontogénique ALP, qui est inhibé lors de l'inhibition de la β -caténine (315).

Sommes toutes, ces études montrent que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle primordial dans l'ostéoblastogenèse, l'odontoblastogenèse et la cémentoblastogenèse. Ainsi, la perturbation de ces phénomènes chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* pourrait bien être médiée à travers l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine.

La surexpression du gène *Pitx1* pourrait perturber en parallèle d'autre(s) voie(s) que la voie Wnt/ β -caténine

Bien que notre étude se soit concentrée sur le rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans la caractérisation du phénotype des souris transgéniques *Colla1-Pitx1*, il est à noter que la surexpression de *Pitx1* pourrait affecter d'autre(s) voie(s) de signalisation et certains gènes comme le gène *Tert*.

D'ailleurs, bien que nous ayons démontré que l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* se fait principalement à travers la surexpression de DKK1, SOST et GSK3 d'autre(s) gène(s) tel que *Tert* pourraient être impliqués. En effet, la surexpression de *Tert* chez les souris C57BL/6J a été rapportée d'activer la transcription de la voie Wnt (316). Appuyant ce rôle, une autre étude indépendante a montré que TERT active la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en servant comme un co-facteur de la β -caténine dans le complexe de transcription (317). Ainsi, l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* pourrait être en partie causée par l'inhibition de l'expression de *mTert* causée par la surexpression de *Pitx1*.

D'autre part, dans un modèle de rates ovariectomisées ostéopéniques la transfection des MSCs avec TERT augmente significativement leur capacité de proliférer et de se différencier (en particulier la capacité de différenciation ostéogénique) augmentant ainsi la densité osseuse de ces rates (318). Il est à noter que, des souris TERC^{-/-} déficiente en télomérase présentent une perte osseuse accélérée (319). Fait intéressant, ces souris présentent plusieurs phénotypes communs avec les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*, tel que le défaut de l'ostéoblastogenèse, la diminution du nombre de colonies des MSCs formées de même que la diminution de leur capacité à se différencier en ostéoblastes et en adipocytes (319). D'autre part, une étude récente a montré la capacité d'immortalisation des cellules humaines normales isolées à partir des tissus dentaires et parodontaux par l'introduction de hTERT (320). Cela suggère que PITX1 pourrait agir en partie *via* l'inhibition de TERT.

D'autre part, bien que nous ayons démontré que l'inhibition de l'ostéoblastogenèse chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* se fait principalement à travers la voie Wnt/ β -caténine, d'autres voies telles que la voie Hedgehog (Hh) et la voie des bone morphogenetic protein (BMPs), qui jouent un rôle important dans l'ostéogenèse, pourraient être impliquées. En effet, il a été démontré que l'induction d'ALP (responsable de la minéralisation de la matrice extracellulaire des ostéoblastes) par Hh est médié à travers l'induction de la voie Wnt/ β -caténine (321). Fait intéressant, la signalisation Hh est indispensable à l'ostéogenèse dans les membres postérieurs (ossification endochondrale), mais elle n'est apparemment pas nécessaire pour le développement de certaines os tels que la mandibule (ossification intramembranaire) (322). D'autre part, bien que des études récentes chez la poule et la grenouille aient montré un rôle pour PITX2 en aval de Sonic hedgehog (Shh), un membre de la famille Hh, dans la régulation de la latéralité du cœur, des intestins et d'autres organes asymétriques aucune étude publiée n'a établie une relation entre les membres de la famille Hh et PITX1 (344, 345). Toutefois, des travaux récents de surexpression ou d'inhibition du facteur de transcription PITX1 dans les chondrocytes humains ont montré un effet dose-dépendant de PITX1 sur l'activité du promoteur du gène Indian hedgehog (Ihh), un autre membre de la famille Hh (mémoire de maîtrise de Lauriane Bernard, Université de Montréal). Cela suggère que PITX1 pourrait agir *via* la voie de signalisation Hh. Par contre, l'altération de

l'ossification des mandibules chez les souris *Colla1-Pitx1* de même que celle des membres postérieurs, suggère que le processus d'ostéogenèse de ces souris ne peut pas dépendre uniquement d'une perturbation de la voie de signalisation Hh.

D'autre part, les BMPs peuvent agir sur la différenciation cellulaire selon deux façons; la première en activant la voie Wnt/ β -caténine et la deuxième indépendamment de cette voie et cela dépendement du stade de différenciation. L'ajout de BMP-2 permet de différencier des cellules embryonnaires de souris en ostéoblastes en augmentant notamment le niveau intracellulaire de la β -caténine. En outre, il a été démontré que l'induction d'ALP (responsable de la minéralisation de la matrice extracellulaire des ostéoblastes) par BMP2 est médiée à travers l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (321).

Le défaut dans la capacité des ostéoblastes de se différencier, provoqué par une délétion de la β -caténine, n'a pas pu être sauvé par l'ajout des BMP-2 (323). D'autre part, alors que Wnt3a et BMP9 ensemble améliorer la capacité l'un de l'autre à induire l'activité de l'ALP, l'inhibition de la β -caténine diminue significativement la capacité ostéo/odontogénique de BMP9 (315). Ces études suggèrent que l'étape de minéralisation, durant la différenciation des ostéoblastes ou des odontoblastes, dépend surtout de la voie Wnt/ β -caténine. D'autre part, il est à mentionner que pendant le développement, BMP4 est capable de réprimer l'expression de *Pitx1* dans le mésenchyme mandibulaire et *Pitx2* au niveau de l'épithélium dentaire (346). En outre, une autre étude a démontré que BMP4 induit la phosphorylation de Smad1 qui sera par la suite recruté sur le promoteur du gène POMC, où il interagit avec *Pitx1* conduisant ainsi à la répression de ce dernier. La répression de *Pitx1* par BMP4 induit un retard dans la différenciation terminale des corticotropes pendant l'organogenèse hypophysaire (347). En outre, une autre étude a montré que PITX2 inhibe le marqueur ostéogénique Ostérix, induit par les BMPs, dans les myoblastes afin d'empêcher leur conversion en ostéoblastes (348). D'ailleurs, un site de liaison consensus de PITX1/2 a été identifié dans le promoteur de la protéine BMP4. Il est à noter, qu'une relation directe entre PITX2 et ce promoteur a été mis en évidence dans des cellules épithéliales dentaires (349). Ces résultats ont mis en évidence un lien moléculaire direct entre les membres de la famille PITX et BMP4. Ce qui suggère que la surexpression de *Pitx1* pourra agir à travers la voie des BMPs en se fixant directement sur le promoteur du BMP4. Fait intéressant, bien que les souris PITX2^{-/-} présentent une

surexpression de BMP4 dans les cellules de l'ectoderme mandibulaire, une expansion similaire du niveau d'expression de BMP4 n'a pas été observée chez les souris PITX1^{-/-} (346, 350). Notamment, l'expression de *Pitx1* imite l'expression ectopique persistante du BMP4 aux premiers stades de développement de la dent. Inversement, la surexpression de *Pitx2* est accompagnée par une absence d'activité de BMP4 (351). Bien que, ces données soient cohérentes avec un modèle dans lequel PITX1 active BMP4 et PITX2 le réprime, PITX peut interagir avec plusieurs co-facteurs pour réguler la transcription d'un gène. C'est donc possible que le choix du co-facteur puisse dicter si PITX1 fonctionne comme activateur ou répresseur transcriptionnel en se fixant sur le promoteur du gène BMP4.

Sommes toutes, ces données montrent que PITX1 pourra agir directement ou indirectement à travers les voies Hh et/ou BMPs afin de dicter conjointement avec la voie Wnt/ β -caténine le phénotype des souris transgéniques *Colla1-Pitx1*.

Contribution possible de Pitx1 dans la régulation de l'adipogenèse

Dans plusieurs modèles de perte osseuse, l'adipogenèse est augmentée. Cela est dû au fait que les MSCs ont tendance à compenser leur diminution de différenciation en ostéoblastes par une augmentation de différenciation en adipocytes. Toutefois, nos résultats ont montré une diminution de la capacité des MSCs provenant des fémurs des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* de se différencier en ostéoblastes et en adipocytes en même temps. Cette diminution a été associée à une diminution du nombre de lipides formés et du niveau d'expression des marqueurs d'adipogènes (PPAR γ , Adipoq et aP2). Ces résultats ont été soutenus par le test de densitométrie qui a montré une diminution significative du pourcentage de gras chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* comparés aux souris non-transgéniques. En outre, ces résultats ont été confirmés par des coupes histologiques au niveau des fémurs provenant de souris transgénique *Colla1-Pitx1* montrant une diminution significative des tissus adipeux comparés avec des souris non-transgéniques.

L'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dirige le destin des cellules mésenchymateuses vers l'ostéoblastogenèse au détriment de l'adipogenèse en induisant l'inhibition de l'expression des marqueurs d'adipogènes (PPAR γ et C/EBP α) et l'augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastiques (Runx2, Dlx5 et ostérix) (324). Toutefois, la surexpression de *Pitx1*, chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*, aboutit à l'inhibition de l'ostéoblastogenèse et de l'adipogenèse en même temps. D'ailleurs, notre modèle de souris transgéniques *Colla1-Pitx1* a montré que la surexpression de *Pitx1* induit l'inhibition de l'expression des marqueurs d'adipogènes tel que PPAR γ . En outre, des expériences (thèse de Cynthia Picard, Université de Montréal) menées au sein du laboratoire de Dr Moreau, ont montré que la perte d'expression de *Pitx1* chez les souris PITX1 $^{-/-}$ et chez les souris PITX1 $^{+/-}$ induit l'augmentation d'une manière dose-dépendante de l'expression de PPAR γ , phénotype observé également chez les patients atteints d'arthrose. Cela suggère que PITX1 doit agir conjointement avec d'autre(s) mécanisme(s) que la voie Wnt/ β -caténine afin d'inhiber l'adipogenèse. En effet, il a été démontré que la BMP4 joue un rôle clé dans la régulation de l'engagement et de la différenciation adipocytaire des cellules précurseurs en induisant l'activation de l'expression de PPAR γ (325). Il convient de noter que, la différenciation des MSCs en cellules adipeuses a été associée à l'induction de l'ARNm de BMP4 et cet effet a été amplifié de façon marquée par la présence de DKK1 (326). A l'inverse, la présence de DKK1 seul n'était pas suffisante pour différencier les MSC en adipocytes (326). Étant donné qu'il a été démontré que BMP4 étaient en mesure de réprimer l'expression de *Pitx1* dans les mésenchymes mandibulaires (327), il peut être concevable que le niveau endogène de BMP4 ne soit pas suffisant pour induire l'adipogenèse lorsque *Pitx1* est surexprimé.

Par conséquent, une inhibition de la voie BMPs suite à la surexpression de *Pitx1* pourrait expliquer la diminution d'adipocytes chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*.

Contribution possible de PITX1 dans la régulation de l'ostéoclastogenèse

Une perte osseuse est généralement causée par diminution de l'ostéoblastogenèse, une augmentation de l'ostéoclastogenèse ou une combinaison des deux.

Le ratio RANKL/OPG régule le niveau de résorption osseuse. En effet, le fonctionnement de ce système, implique la présence des ostéoblastes qui sécrètent le RANKL et l'OPG. RANKL se lie au récepteur RANK présent au niveau de la membrane des pré-ostéoclastes menant à l'activation, la différenciation et à la fusion de ces cellules. La glycoprotéine OPG est également sécrétée par les ostéoblastes mais, sa présence a pour but de neutraliser RANKL. En se faisant, la biodisponibilité de RANKL sera diminuée réduisant ainsi l'activation du récepteur RANK et la résorption osseuse. D'ailleurs, lorsqu'on inhibe l'OPG, une augmentation de la résorption osseuse est observée (328). L'idée que les ostéoblastes contrôlent la différenciation et la fonction des ostéoclastes date d'il ya plus de 30 ans (329). Toutefois, récemment plusieurs études ont attribué un rôle aux ostéocytes dans ce processus. En effet, deux études indépendantes ont présenté les ostéocytes comme une source majeure de l'activateur ostéoclastogénique (RANKL) (330, 331).

D'un autre part, des observations récentes suggèrent que la signalisation Wnt/ β -caténine dans les ostéoblastes régule la masse osseuse en contrôlant la différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. En effet, la stabilisation de la β -caténine dans des ostéoblastes différenciés induit une augmentation de la masse osseuse, tandis que sa suppression conduit à l'ostéopénie. Ces résultats démontrent que la β -caténine et la signalisation Wnt vraisemblablement, favorisent la capacité des ostéoblastes différenciés à inhiber la différenciation des ostéoclastes en régulant l'expression de l'OPG (332). En outre, une autre étude appuyant la première montre que la perte de fonction de la β -caténine dans les ostéoblastes provenant de souris génétique modifiées conduit à une ostéopénie sévère causée par une augmentation significative des ostéoclastes. Les ostéoblastes de ces souris présentent une altération au niveau de la maturation et la minéralisation avec une augmentation de RANKL et une diminution de

l'OPG. En revanche, l'activation de la β -caténine entraîne une augmentation considérable de la masse osseuse accompagnée d'une diminution significative des ostéoclastes. Les ostéoblastes de ces souris sont normaux. Toutefois ils démontrent une diminution des niveaux circulants en RANKL et une augmentation de l'OPG (333). D'ailleurs, plusieurs études ont montré que la voie de signalisation Wnt/ β -caténine inhibe l'ostéoclastogenèse en augmentant l'expression de l'OPG et en inhibant celle de RANKL (334, 335). Toutefois, la SOST et la DKK1 (deux antagonistes de la voie Wnt/ β -caténine) induisent une augmentation des niveaux circulants de RANKL et une diminution des niveaux de l'OPG induisant une augmentation du ratio RANKL/OPG (336-338).

Toutefois, les analyses biochimiques des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* montrent une diminution du ratio RANKL/OPG comparés aux souris non-transgéniques suggérant une diminution de l'ostéoclastogenèse. En effet, l'augmentation du nombre des travées d'un part et de la structure en forme de plaque d'un autre part chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* pourrait être expliquée par la diminution de l'ostéoclastogenèse à ce niveau. Cela a été confirmé par l'analyse des résultats d'histomorphométries et le test de TRAP qui ont montré une diminution significative du nombre d'ostéoclastes au niveau trabéculaire chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* comparés aux souris sauvages. PITX1 affecte négativement à la fois le nombre et la fonction des ostéoblastes et des ostéoclastes, avec le résultat d'une réduction nette de la masse osseuse. Dans quelques autres exemples dans lesquels une protéine retarde à la fois la formation et la résorption osseuse, le résultat était toujours une diminution de la masse osseuse (339-342). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la formation osseuse est plus lente que la résorption osseuse. Toutefois, la diminution de l'épaisseur de l'os cortical et l'augmentation de sa porosité d'un part et l'augmentation de la résorption au niveau de l'os alvéolaire et mandibulaire d'un autre part chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* montrent une augmentation de l'ostéoclastogenèse à ce niveau.

Les ostéoclastes se forment au niveau de différents sites squelettiques à des différentes fins. Les résultats des études de deletions conditionnelles de RANKL démontrent que les ostéoclastes qui se forment à ces différents sites nécessitent des cellules de soutien différentes dans chaque cas (330, 331, 343, 344). En effet, il a été démontré qu'une suppression de RANKL dans les ostéoblastes matures induit un échec de

l'éruption des dents. En outre, la suppression germinale de RANKL induit une forme atypique des fémurs (345). Toutefois, les souris dépourvues de RANKL dans leurs ostéocytes présentent des fémurs d'une forme normale. Cependant, ces souris présentent un nombre réduit d'ostéoclastes dans l'os trabéculaire ainsi qu'une réduction des marqueurs de résorption osseuse.

Ces données suggèrent fortement que les ostéocytes sont une source essentielle du RANKL contrôlant la formation des ostéoclastes au cours de remodelage osseux trabéculaire. Cependant la modélisation du cortex métaphysaire des os longs est contrôlée par des cellules autres que les ostéocytes (331). En plus, la conclusion selon laquelle le RANKL dérivé des ostéocytes n'est pas requis pour l'éruption des dents démontre que d'autres types cellulaires doivent fournir le RANKL requis pour ce processus (331).

De ce fait, ces résultats montrent que la surexpression de *Pitx1* pourrait agir à travers plusieurs mécanismes induisant l'augmentation du nombre d'ostéoclastes à certains niveaux (os cortical, alvéolaire et mandibulaire) et sa diminution à d'autre (os trabéculaire).

D'autre part, la voie BMP joue un rôle important dans le développement normal des os et de la régulation de la résorption osseuse en stimulant les ostéoblastes et les ostéoclastes en même temps (346). En effet, la surexpression de Noggin, un antagoniste de BMP, induit une réduction du nombre d'ostéoclastes, ainsi que du taux de formation osseuse, phénotype similaire à celui trouvés chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*. Par conséquent, l'inhibition de la voie des BMPs suite à la surexpression de *Pitx1* pourrait expliquer la diminution d'ostéoclastes chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*.

Bien que, ces résultats montrent que le phénotype des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* (la diminution de la formation et de la minéralisation osseuse, la diminution de la différenciation cellulaire des MSCs, l'inhibition de l'ostéoblastogenèse, de l'odontoblastogenèse et de la cémentoblastogenèse) est due en grande partie à l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine, il s'avère évident que la surexpression de *Pitx1* affecte d'autre(s) voie(s) de signalisation comme les BMPs et certains gènes comme le gène *Tert*.

Un schéma présenté ci-dessous résume les mécanismes hypothétiques par lesquels la surexpression de *Pitx1* pourrait induire les phénotypes décrits dans les deux manuscrits.

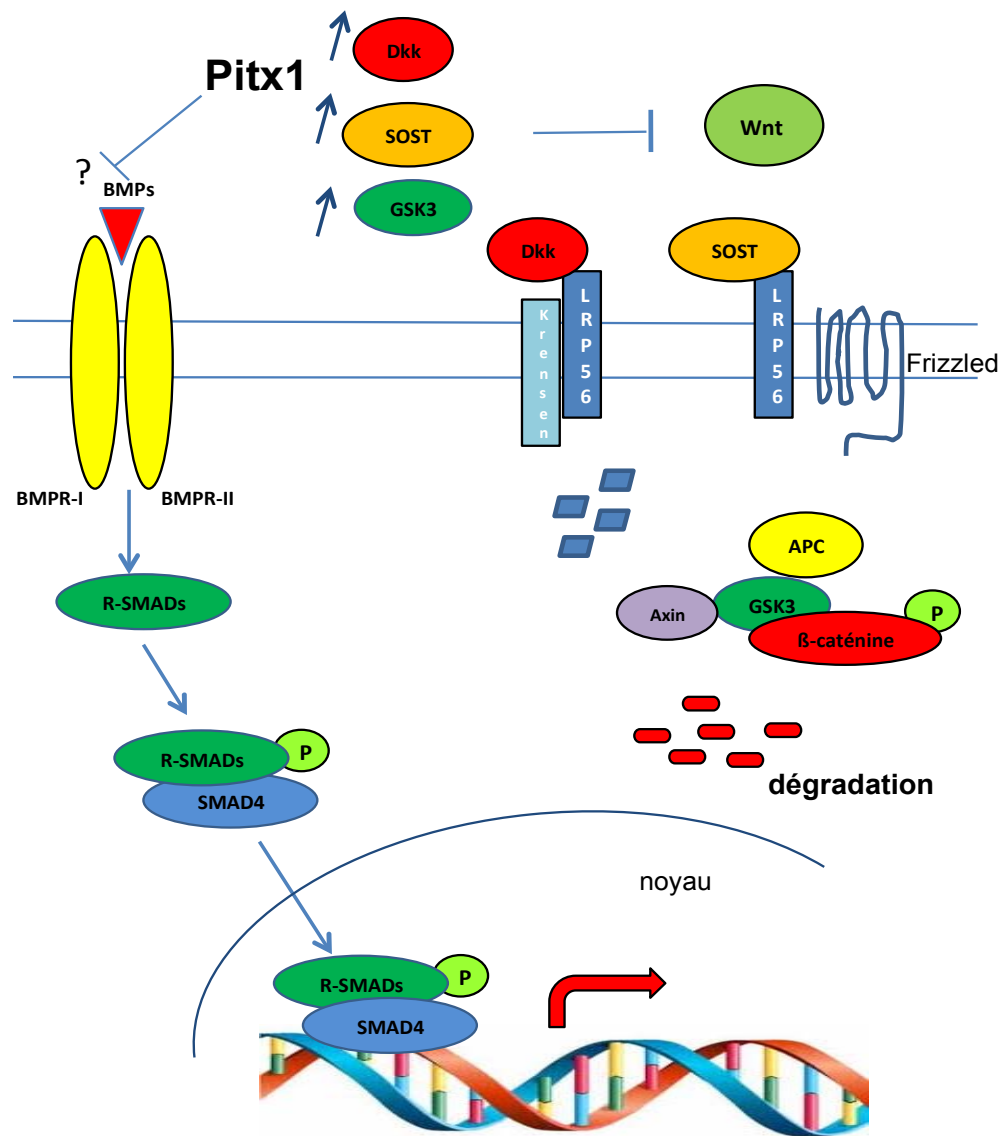


Figure 6: Schéma résumant les mécanismes hypothétiques par lesquels la surexpression de *Pitx1* pourrait induire les phénotypes décrits dans les deux manuscrits. En effet, la surexpression de *Pitx1* induit l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine en augmentant l'expression de *Dkk1*, *Sost* et de *Gsk3*. Conjointement, PITX1 pourrait agir à travers d'autres voies telles que la voie des BMPs. Dans ce cas, la surexpression de *Pitx1* pourrait inhiber la voie des BMPs directement en se fixant sur un promoteur d'un membre des BMPs ou indirectement à travers l'inhibition d'un ou de plusieurs autre(s) gène(s) ou voie(s). Ainsi, l'activation des SMADs via la liaison sur les récepteurs BMPR-I et BMPR-II sera inhibée (347, 348).

Chapitre 5 : Perspectives et conclusion

Perspectives

Dans le contexte de cette étude, nous avons identifié le facteur de transcription PITX1, dont la surexpression chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* entraîne l'apparition de symptômes similaires à ceux de l'ostéoporose et des maladies parodontales. Compte tenu de la grande hétérogénéité au niveau clinique de l'ostéoporose et des maladies parodontales, des recherches cliniques doivent être entreprises pour déterminer si un gain d'expression de *Pitx1* survient chez les patients atteints d'ostéoporose et/ou de maladies parodontales. La détermination de polymorphismes responsables de la surexpression de *Pitx1* chez les patients ostéoporotiques présentant des problèmes parodontaux pourrait servir de marqueur génétique pour prévoir l'apparition précoce des deux maladies. Dans ce contexte, il serait potentiellement intéressant de prioriser les enfants atteints du spectre de l'autisme et les enfants atteints de leucémie aiguë. En effet, plusieurs études ont rapporté une diminution de la masse osseuse chez des enfants atteints d'autisme (46-48). D'autre part, plusieurs études ont montré une corrélation positive entre les maladies parodontales et l'autisme. En effet, la prévalence des maladies parodontales s'avère très élevée chez les patients autistes. Outre le manque d'hygiène dentaire au quotidien qui est un facteur externe confondant, ces patients sont possiblement plus susceptibles de développer des maladies parodontales suite à une prédisposition génétique (205-207). En effet, une autre étude a montré une forte association entre deux SNPs au sein du gène *Pitx1* et l'autisme (349). Bien que le niveau d'expression de *Pitx1* chez les patients autistes n'ait jamais été évalué, nous pensons que ces SNPs pouvaient être associés à une surexpression de *Pitx1*. Les niveaux élevés de pro-opio-mélanocortine (POMC) et de l'adrénocorticotropine (ACTH), des gènes qui se trouvent en aval de PITX1, chez les patients autistes supportent cette hypothèse (350, 351). Il est donc concevable que la surexpression de PITX1 chez les patients autistes pourrait expliquer la diminution de la densité osseuse et les problèmes parodontaux observés chez ces patients. D'autre part, plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la leucémie lymphoblastique et la fragilité osseuse. En effet, une forte incidence de fractures vertébrales a été observée chez certains enfants atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë avant même le début des traitements de chimiothérapie

(39). Cet aspect passe inaperçu car plusieurs études ont montré que la densité osseuse des enfants atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë diminue après le traitement de la chimiothérapie (41, 42). En effet, la chimiothérapie, les stéroïdes et l'hormonothérapie peuvent accroître le risque d'ostéoporose. D'autre part, une corrélation positive entre la leucémie lymphoblastique et les problèmes parodontaux a été démontrée. En plus, des manifestations parodontales tels qu'une raréfaction osseuse, un amincissement de la lamina dura, une résorption importante des crêtes alvéolaires et des lésions périapicales ont été observés dans 30 différents patients atteints de leucémie (la leucémie lymphoblastique aiguë LLA et la leucémie lymphoïde chronique LLC) avant la chimiothérapie (203). Il est à noter que, la surexpression de *Pitx1* dans les cellules T a été démontrée chez 9 % des patients atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë suite à une délétion chromosomique au niveau du locus 5q31 (352). Sommes toutes, ces études montrent que la surexpression de *Pitx1* chez les patients atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë peut être sous-jacente à la diminution de la densité osseuse et les problèmes parodontaux chez certains patients leucémiques avant même le début des traitements de chimiothérapie. Dans ce contexte des recherches doivent être entreprises pour mesurer les niveaux d'expression de *Pitx1* et pour identifier les polymorphismes responsables de sa surexpression chez les patients atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë ou de l'autisme présentant une diminution de la densité osseuse et des problèmes parodontaux. Toutefois, l'identification de *Pitx1* comme gène responsable du phénotype ostéoporotique et des problèmes parodontaux chez les patients atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë ou de l'autisme ouvrira la porte sur la possibilité de trouver une cible thérapeutique (des agonistes de la voie Wnt) afin d'améliorer les traitements et la qualité de vie de ces patients. Dans cette perspective, nos résultats ont montré que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine par la consommation de chlorure de lithium (LiCl), un activateur de cette voie, chez des souris ostéoporotiques *Colla1-Pitx1* induit une augmentation de la densité osseuse accompagnée d'une amélioration de la microarchitecture osseuse. Cependant, l'effet de ce traitement n'a pas été étudié au niveau cellulaire. La reproduction des tests (d'histologie, d'histomorphométries et de différenciation cellulaire) qui nous ont permis de caractériser le phénotype des souris transgéniques *Colla1-Pitx1*, sur les souris traitées avec le LiCl nous permettra de définir

plus précisément le rôle de l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement de l'ostéoporose.

Plusieurs phénomènes observés chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*, tel que la diminution des ostéoclastes, des chondrocytes et des adipocytes, ont été attribués à une altération d'une ou de plusieurs autre voie(s) que la voie Wnt/ β -caténine causé par la surexpression de *Pitx1*. Des recherches plus poussées doivent être entreprises afin de vérifier si les voies des BMPs et/ou de Hh sont impliquées dans ce processus.

L'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans les tissus parodontaux des souris transgéniques *Colla1-Pitx1* n'a pas été testée directement. La reproduction des tests effectués au niveau des ostéoblastes sur des odontoblastes, provenant du tissu parodontal pourrait confirmer l'implication de cette voie dans le développement des maladies parodontales chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* tout comme chez l'humain éventuellement. Bien que l'hypominéralisation des dents soit un processus irréversible, il est encore trop tôt pour savoir si le traitement des souris avec le chlorure de lithium pourrait également prévenir les maladies parodontales ou à tout le moins en réduire la sévérité. Cet aspect n'a pas été caractérisé dans le cadre de cette thèse et mérite à ce qu'on s'y attarde. D'ailleurs, il a été rapporté que, la stimulation des fibroblastes provenant du ligament parodontal avec du chlorure de lithium (LiCl), un activateur de la voie Wnt canonique, induit une augmentation significative des nodules minéralisés et de l'expression des gènes ostéogéniques ce qui implique un rôle important de la signalisation dans la minéralisation du tissu parodontale (353).

Enfin, le mécanisme par lequel la surexpression de *Pitx1* induit l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, mise en valeur dans cette thèse, n'a pas encore été établi. Des recherches plus poussées doivent être entreprises afin de comprendre ce mécanisme.

Conclusion

Cette étude a montré qu'il y a une corrélation importante entre l'ostéoporose et les maladies parodontales et que le facteur de transcription PITX1 pourrait être un joueur clé dans ces deux pathologies. Sa surexpression constitue, en effet, un facteur de risque pour le développement de l'ostéoporose, avec des répercussions importantes également sur les dents et les os qui, en se déminéralisant, favorisent justement l'apparition et la progression de la parodontite.

Contrairement aux humains, les souris ne développent pas naturellement la maladie parodontale (354). Pour cela, l'induction de la parodontite expérimentale chez la souris est habituellement obtenue par gavage oral avec des pathogènes parodontaux humains (355-358). Suite à l'infection orale, plusieurs semaines sont nécessaires avant l'induction d'une perte osseuse parodontale mesurable. Cette perte peut être accéléré par le placement des ligatures pathogènes autour des dents mais, plusieurs jours sont nécessaires avant que la perte osseuse devienne évidente (359). Pour cela, les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* peuvent être considérées comme un modèle animal prometteur pour étudier les maladies parodontales. Ce modèle peut constituer un outil relativement peu coûteux, très rapide et pratique pour étudier d'avantage la maladie parodontale. En outre, la relation entre l'ostéoporose et la parodontite orale est encore inconnue car ces deux phénomènes sont souvent étudiés séparément. Pour cela, les transgéniques *Colla1-Pitx1* pourront représenter un modèle unique adapté à élargir notre connaissance sur la relation entre ces deux maladies.

Dans le cadre de notre étude, nous avons mis en évidence que PITX1 régule la formation osseuse non seulement au cours du développement mais aussi pendant le remodelage osseux. Les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* surexprimant *Pitx1* dans leurs ostéoblastes présentaient une diminution de la formation et de la minéralisation osseuse au niveau de leurs membres postérieurs, des mâchoires et des dents.

Nos résultats ont montré que l'augmentation de l'expression de *Pitx1* induit l'inactivation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1*. L'altération de l'ostéoblastogenèse, de l'odontoblastogenèse et de la cémentoblastogenèse ont été attribués en partie à l'inactivation de la voie Wnt/ β -caténine et il est fort possible que d'autres voies de signalisation soient également impliquées.

En effet, une inactivation de la voie des BMPs chez les souris transgéniques *Colla1-Pitx1* pourrait expliquer la diminution du nombre d'adipocytes et des ostéoclastes.

De plus, la compréhension du mécanisme par lequel PITX1 induit l'ostéoporose ouvre la porte à la possibilité de mieux stratifier les patients ostéoporotiques et de trouver de nouvelles thérapies.

References

1. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;843:1-129.
2. NIH consensus statement: osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. National Institutes of Health. 2000:1-45.
3. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Jama*. 2001;285(6):785-95.
4. Tenenhouse A, Joseph L, Kreiger N, Poliquin S, Murray TM, Blondeau L, et al. Estimation of the prevalence of low bone density in Canadian women and men using a population-specific DXA reference standard: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Osteoporos Int*. 2000;11(10):897-904.
5. Sturtridge W, Lentle B, Hanley DA. Prevention and management of osteoporosis: consensus statements from the Scientific Advisory Board of the Osteoporosis Society of Canada. 2. The use of bone density measurement in the diagnosis and management of osteoporosis. *Cmaj*. 1996;155(7):924-9.
6. Brown JP, Fortier M, Frame H, Lalonde A, Papaioannou A, Senikas V, et al. Canadian Consensus Conference on osteoporosis, 2006 update. *J Obstet Gynaecol Can*. 2006;28(2 Suppl 1):S95-112.
7. Tarride JE, Hopkins RB, Leslie WD, Morin S, Adachi JD, Papaioannou A, et al. The burden of illness of osteoporosis in Canada. *Osteoporos Int*. 2012;23(11):2591-600.
8. Melton LJ, 3rd, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL. Perspective. How many women have osteoporosis? *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1992;7(9):1005-10.
9. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D. Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int*. 2000;11(7):556-61.
10. Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol*. 1993;137(9):1001-5.
11. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21(2):115-37.
12. Burr DB. Introduction--Bone turnover and fracture risk. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2003;3(4):408-9.
13. Templeton K. Secondary osteoporosis. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005;13(7):475-86.
14. Becker C. Pathophysiology and clinical manifestations of osteoporosis. *Clin Cornerstone*. 2006;8(1):19-27.
15. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(12):3318-25.
16. Stein E, Shane E. Secondary osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32(1):115-34, vii.
17. Papaioannou A, Morin S, Cheung AM, Atkinson S, Brown JP, Feldman S, et al. 2010 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada: summary. *Cmaj*. 2010;182(17):1864-73.

18. Siminoski K, Leslie WD, Frame H, Hodsman A, Josse RG, Khan A, et al. Recommendations for bone mineral density reporting in Canada. *Can Assoc Radiol J*. 2005;56(3):178-88.
19. Cranney A, Jamal SA, Tsang JF, Josse RG, Leslie WD. Low bone mineral density and fracture burden in postmenopausal women. *Cmaj*. 2007;177(6):575-80.
20. Bessette L, Ste-Marie LG, Jean S, Davison KS, Beaulieu M, Baranci M, et al. The care gap in diagnosis and treatment of women with a fragility fracture. *Osteoporos Int*. 2008;19(1):79-86.
21. Brown JP, Josse RG. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Cmaj*. 2002;167(10 Suppl):S1-34.
22. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, De Laet C, Jonsson B. Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporos Int*. 2001;12(12):989-95.
23. Roux C, Breuil V, Orcel P, Fardellone P. [Diagnosis of osteoporosis]. *Rev Prat*. 2004;54(19):2107-19.
24. Baldock PA, Eisman JA. Genetic determinants of bone mass. Current opinion in rheumatology. 2004;16(4):450-6.
25. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC, Jr. Genetic factors in determining bone mass. *The Journal of clinical investigation*. 1973;52(11):2800-8.
26. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *The Journal of clinical investigation*. 1987;80(3):706-10.
27. Krall EA, Dawson-Hughes B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1993;8(1):1-9.
28. Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1995;10(12):2017-22.
29. Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: a study of postmenopausal twins. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996;11(4):530-4.
30. Arden NK, Spector TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(12):2076-81.
31. Hunter D, De Lange M, Snieder H, MacGregor AJ, Swaminathan R, Thakker RV, et al. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(2):371-8.
32. Kaprio J, Rimpela A, Winter T, Viken RJ, Rimpela M, Rose RJ. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum Biol*. 1995;67(5):739-53.
33. Snieder H, MacGregor AJ, Spector TD. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(6):1875-80.

34. Kelly PJ, Nguyen T, Hopper J, Pocock N, Sambrook P, Eisman J. Changes in axial bone density with age: a twin study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1993;8(1):11-7.
35. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW, Johnston CC, Jr. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet*. 1989;44(3):429-33.
36. Nilas L, Christiansen C. Bone mass and its relationship to age and the menopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1987;65(4):697-702.
37. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(10):1203-4.
38. Rosen CJ. Endocrine disorders and osteoporosis. *Current opinion in rheumatology*. 1997;9(4):355-61.
39. Alos N, Grant RM, Ramsay T, Halton J, Cummings EA, Miettinen PM, et al. High incidence of vertebral fractures in children with acute lymphoblastic leukemia 12 months after the initiation of therapy. *J Clin Oncol*. 2012;30(22):2760-7.
40. Gurevitch O, Khitrin S, Valitov A, Slavin S. Osteoporosis of hematologic etiology. *Experimental Hematology*. 2007;35(1):128-36.
41. Athanassiadou F, Tragiannidis A, Rouso I, Katsos G, Sidi V, Papageorgiou T, et al. Bone mineral density in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Turk J Pediatr*. 2006;48(2):101-4.
42. Arikoski P, Komulainen J, Voutilainen R, Riikonen P, Parviainen M, Tapanainen P, et al. Reduced bone mineral density in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998;20(3):234-40.
43. Star VL, Hochberg MC. Osteoporosis in patients with rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 1994;20(3):561-76.
44. Forsblad D'Elia H, Larsen A, Waltbrand E, Kvist G, Mellstrom D, Saxne T, et al. Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(7):617-23.
45. Katz S, Weinerman S. Osteoporosis and gastrointestinal disease. *Gastroenterology & hepatology*. 2010;6(8):506-17.
46. Hediger ML, England LJ, Molloy CA, Yu KF, Manning-Courtney P, Mills JL. Reduced bone cortical thickness in boys with autism or autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord*. 2008;38(5):848-56.
47. Neumeyer AM, Gates A, Ferrone C, Lee H, Misra M. Bone density in peripubertal boys with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2013;43(7):1623-9.
48. Soden SE, Garrison CB, Egan AM, Beckwith AM. Nutrition, physical activity, and bone mineral density in youth with autistic spectrum disorders. *J Dev Behav Pediatr*. 2012;33(8):618-24.
49. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature medicine*. 2013;19(2):179-92.
50. Wang HY. WNT-frizzled signaling via cyclic GMP. *Front Biosci*. 2004;9:1043-7.
51. Harada S-i, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003;423(6937):349-55.
52. Zorn AM. Wnt signalling: Antagonistic Dickkopfs. *Current Biology*. 2001;11(15):R592-R5.

53. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. 2002;417(6889):664-7.
54. Wu W, Glinka A, Delius H, Niehrs C. Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Current biology : CB*. 2000;10(24):1611-4.
55. Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, et al. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*. 2004;13(1):149-56.
56. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr Iii GH, Flynn C, et al. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Molecular Cell*. 2001;7(4):801-9.
57. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G-H, Tan Y, et al. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell*. 2002;108(6):837-47.
58. Spiegelman VS, Slaga TJ, Pagano M, Minamoto T, Ronai Z, Fuchs SY. Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell*. 2000;5(5):877-82.
59. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367(6460):284-7.
60. Sano M, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Emi M, Shiraki M, et al. Association of Estrogen Receptor Dinucleotide Repeat Polymorphism with Osteoporosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;217(1):378-83.
61. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Emi M, Muramatsu M, et al. Association of Estrogen Receptor β Gene Polymorphism with Bone Mineral Density. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;269(2):537-41.
62. Miyao M, Hosoi T, Emi M, Nakajima T, Inoue S, Hoshino S, et al. Association of bone mineral density with a dinucleotide repeat polymorphism at the calcitonin (CT) locus. *J Hum Genet*. 2000;45(6):346-50.
63. Masi L, Becherini L, Colli E, Gennari L, Mansani R, Falchetti A, et al. Polymorphisms of the calcitonin receptor gene are associated with bone mineral density in postmenopausal Italian women. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;248(1):190-5.
64. Hosoi T, Miyao M, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, et al. Association study of parathyroid hormone gene polymorphism and bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Calcified tissue international*. 1999;64(3):205-8.
65. Minagawa M, Yasuda T, Watanabe T, Minamitani K, Takahashi Y, Goltzman D, et al. Association between AAAG repeat polymorphism in the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene and adult height, urinary pyridinoline excretion, and promoter activity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(4):1791-6.
66. Masi L, Becherini L, Gennari L, Amedei A, Colli E, Falchetti A, et al. Polymorphism of the aromatase gene in postmenopausal Italian women: distribution and correlation with bone mass and fracture risk. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(5):2263-9.
67. Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased

sensitivity to glucocorticoids in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(1):144-51.

68. Tsukamoto K, Orimo H, Hosoi T, Miyao M, Ota N, Nakajima T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the human calcium-sensing receptor locus. *Calcified tissue international*. 2000;66(3):181-3.

69. Sowers M, Willing M, Burns T, Deschenes S, Hollis B, Crutchfield M, et al. Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14(8):1411-9.

70. Chao TH, Yu HN, Huang CC, Liu WS, Tsai YW, Wu WT. Association of interleukin-1 beta (-511C/T) polymorphisms with osteoporosis in postmenopausal women. *Ann Saudi Med*. 2010;30(6):437-41.

71. Keen RW, Woodford-Richens KL, Lanchbury JS, Spector TD. Allelic variation at the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early postmenopausal bone loss at the spine. *Bone*. 1998;23(4):367-71.

72. Murray RE, McGuigan F, Grant SF, Reid DM, Ralston SH. Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone*. 1997;21(1):89-92.

73. Fontova R, Gutierrez C, Vendrell J, Broch M, Vendrell I, Simon I, et al. Bone mineral mass is associated with interleukin 1 receptor autoantigen and TNF-alpha gene polymorphisms in post-menopausal Mediterranean women. *J Endocrinol Invest*. 2002;25(8):684-90.

74. Spotila LD, Rodriguez H, Koch M, Adams K, Caminis J, Tenenhouse HS, et al. Association of a polymorphism in the TNFR2 gene with low bone mineral density. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2000;15(7):1376-83.

75. Dickson IR, Gwilliam R, Arora M, Murphy S, Khaw KT, Phillips C, et al. Lumbar vertebral and femoral neck bone mineral density are higher in postmenopausal women with the alpha 2HS-glycoprotein 2 phenotype. *Bone Miner*. 1994;24(3):181-8.

76. Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat Genet*. 1996;14(2):203-5.

77. Lau EM, Choy DT, Li M, Woo J, Chung T, Sham A. The relationship between COL1 A1 polymorphisms (Sp 1) and COL1 A2 polymorphisms (Eco R1 and Puv II) with bone mineral density in Chinese men and women. *Calcified tissue international*. 2004;75(2):133-7.

78. Dohi Y, Iki M, Ohgushi H, Gojo S, Tabata S, Kajita E, et al. A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: the possibility of a correlation with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1998;13(10):1633-9.

79. Medici M, van Meurs JBJ, Rivadeneira F, Zhao H, Arp PP, Hofman A, et al. BMP-2 Gene Polymorphisms and Osteoporosis: The Rotterdam Study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006;21(6):845-54.

80. Stykarsdottir U, Cazier J-B, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, et al. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS biology*. 2003;1(3):E69.

81. Ramesh Babu L, Wilson SG, Dick IM, Islam FMA, Devine A, Prince RL. Bone mass effects of a BMP4 gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone*. 2005;36(3):555-61.
82. Vaughan T, Pasco JA, Kotowicz MA, Nicholson GC, Morrison NA. Alleles of RUNX2/CBFA1 Gene Are Associated With Differences in Bone Mineral Density and Risk of Fracture. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002;17(8):1527-34.
83. Vaughan T, Reid DM, Morrison NA, Ralston SH. RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women; interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone*. 2004;34(6):1029-36.
84. Doecke JD, Day CJ, Stephens AS, Carter SL, van Daal A, Kotowicz MA, et al. Association of functionally different RUNX2 P2 promoter alleles with BMD. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006;21(2):265-73.
85. Miyao M, Hosoi T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, et al. Polymorphism of insulin-like growth factor I gene and bone mineral density. *Calcified tissue international*. 1998;63(4):306-11.
86. Uitterlinden AG, Arp PP, Paeper BW, Charmley P, Proll S, Rivadeneira F, et al. Polymorphisms in the Sclerosteosis/van Buchem Disease Gene (SOST) Region Are Associated with Bone-Mineral Density in Elderly Whites. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;75(6):1032-45.
87. Langdahl BL, Knudsen JY, Jensen HK, Gregersen N, Eriksen EF. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone*. 1997;20(3):289-94.
88. Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U, Chevalley T, Bonjour J-P, Dermitzakis ET, et al. Polymorphisms in the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Gene Are Associated with Variation in Vertebral Bone Mass, Vertebral Bone Size, and Stature in Whites. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;74(5):866-75.
89. Riancho JA, Olmos JM, Pineda B, Garcia-Ibarbia C, Perez-Nunez MI, Nan DN, et al. Wnt receptors, bone mass, and fractures: gene-wide association analysis of LRP5 and LRP6 polymorphisms with replication. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(1):123-31.
90. Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*. 2006;39(4):754-66.
91. Wang FS, Ko JY, Yeh DW, Ke HC, Wu HL. Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology*. 2008;149(4):1793-801.
92. Mak YT, Hampson G, Beresford JN, Spector TD. Variations in genome-wide gene expression in identical twins - a study of primary osteoblast-like culture from female twins discordant for osteoporosis. *BMC Genet*. 2004;5:14.
93. Giraudeau FS, McGinnis RE, Gray IC, O'Brien EJ, Doncaster KE, Spurr NK, et al. Characterization of common genetic variants in cathepsin K and testing for association with bone mineral density in a large cohort of perimenopausal women from Scotland.

Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2004;19(1):31-41.

94. Arko B, Prezelj J, Komel R, Kocijancic A, Hudler P, Marc J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2002;87(9):4080-4.

95. Gong Y, Liu J, Warman ML. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. Journal Name: American Journal of Human Genetics; Journal Volume: 59; Journal Issue: 1; Other Information: PBD: Jul 1996. 1996:Medium: X; Size: pp. 146-51.

96. Johnson ML, Gong G, Kimberling W, Recker SM, Kimmel DB, Recker RR. Linkage of a Gene Causing High Bone Mass to Human Chromosome 11 (11q12-13). The American Journal of Human Genetics. 1997;60(6):1326-32.

97. Koller DL, Rodriguez LA, Christian JC, Slemenda CW, Econs MJ, Hui SL, et al. Linkage of a QTL contributing to normal variation in bone mineral density to chromosome 11q12-13. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 1998;13(12):1903-8.

98. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. Cell. 2001;107(4):513-23.

99. Little RD, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao S-C, Eustace B, et al. A Mutation in the LDL Receptor-Related Protein 5 Gene Results in the Autosomal Dominant High-Bone-Mass Trait. The American Journal of Human Genetics. 2002;70(1):11-9.

100. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. N Engl J Med. 2002;346(20):1513-21.

101. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, et al. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2003;18(6):960-74.

102. Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, et al. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. Am J Hum Genet. 2003;72(3):763-71.

103. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, 2nd, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol. 2002;157(2):303-14.

104. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 2008;23(6):860-9.

105. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. The EMBO journal. 2003;22(23):6267-76.

106. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*. 2005;437(7062):1173-8.
107. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(29):26770-5.
108. Balemans W, Van Wesenbeeck L, Van Hul W. A clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcified tissue international*. 2005;77(5):263-74.
109. Balemans W, Van Den Ende J, Freire Paes-Alves A, Dikkers FG, Willems PJ, Vanhoenacker F, et al. Localization of the Gene for Sclerosteosis to the van Buchem Disease–Gene Region on Chromosome 17q12–q21. *The American Journal of Human Genetics*. 1999;64(6):1661-9.
110. Van Hul W, Balemans W, Van Hul E, Dikkers FG, Obee H, Stokroos RJ, et al. Van Buchem Disease (Hyperostosis Corticalis Generalisata) Maps to Chromosome 17q12-q21. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;62(2):391-9.
111. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet*. 2001;10(5):537-43.
112. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, et al. Bone Dysplasia Sclerosteosis Results from Loss of the SOST Gene Product, a Novel Cystine Knot–Containing Protein. *The American Journal of Human Genetics*. 2001;68(3):577-89.
113. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, et al. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet*. 2002;39(2):91-7.
114. Loots GG, Kneissel M, Keller H, Baptist M, Chang J, Collette NM, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease. *Genome Res*. 2005;15(7):928-35.
115. Gardner JC, van Bezooijen RL, Mervis B, Hamdy NA, Lowik CW, Hamersma H, et al. Bone mineral density in sclerosteosis; affected individuals and gene carriers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(12):6392-5.
116. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FE, Grant SF, et al. Relation of alleles of the collagen type Ialpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 1998;338(15):1016-21.
117. Balemans W, Foernzler D, Parsons C, Ebeling M, Thompson A, Reid DM, et al. Lack of association between the SOST gene and bone mineral density in perimenopausal women: analysis of five polymorphisms. *Bone*. 2002;31(4):515-9.
118. Ahmed SF, Fouda N, Abbas AA. Serum dickkopf-1 level in postmenopausal females: correlation with bone mineral density and serum biochemical markers. *Journal of osteoporosis*. 2013;2013:460210.
119. Wang FS, Ko JY, Lin CL, Wu HL, Ke HJ, Tai PJ. Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. A histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone*. 2007;40(2):485-92.
120. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006;21(6):934-45.

121. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):733-59.
122. Fuchs-Young R, Glasebrook AL, Short LL, Draper MW, Rippy MK, Cole HW, et al. Raloxifene is a tissue-selective agonist/antagonist that functions through the estrogen receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1995;761:355-60.
123. Deal C, Gideon J. Recombinant human PTH 1-34 (Forteo): an anabolic drug for osteoporosis. *Cleve Clin J Med.* 2003;70(7):585-6, 9-90, 92-4 passim.
124. Miller PD. Denosumab: anti-RANKL antibody. *Curr Osteoporos Rep.* 2009;7(1):18-22.
125. Ebeling PR, Russell RG. Teriparatide (rhPTH 1-34) for the treatment of osteoporosis. *Int J Clin Pract.* 2003;57(8):710-8.
126. Glantschnig H, Scott K, Hampton R, Wei N, McCracken P, Nantermet P, et al. A rate-limiting role for Dickkopf-1 in bone formation and the remediation of bone loss in mouse and primate models of postmenopausal osteoporosis by an experimental therapeutic antibody. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(2):568-78.
127. Lewiecki EM. Sclerostin: a novel target for intervention in the treatment of osteoporosis. *Discov Med.* 2011;12(65):263-73.
128. van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowik CW. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(3):319-27.
129. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2009;24(4):578-88.
130. Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2010;25(5):948-59.
131. Li X, Warmington KS, Niu QT, Asuncion FJ, Barrero M, Grisanti M, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass, and bone strength in aged male rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2010;25(12):2647-56.
132. Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2011;26(1):19-26.
133. Glantschnig H, Hampton RA, Lu P, Zhao JZ, Vitelli S, Huang L, et al. Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(51):40135-47.
134. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(12):2152-9.

135. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature medicine*. 2007;13(2):156-63.
136. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(2):371-9.
137. Kulkarni NH, Onyia JE, Zeng Q, Tian X, Liu M, Halladay DL, et al. Orally Bioavailable GSK-3 α/β Dual Inhibitor Increases Markers of Cellular Differentiation In Vitro and Bone Mass In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2006;21(6):910-20.
138. Wang FS, Ko JY, Weng LH, Yeh DW, Ke HJ, Wu SL. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β attenuates glucocorticoid-induced bone loss. *Life sciences*. 2009;85(19-20):685-92.
139. Gambardella A, Nagaraju CK, O'Shea PJ, Mohanty ST, Kottam L, Pilling J, et al. Glycogen synthase kinase-3 α/β inhibition promotes in vivo amplification of endogenous mesenchymal progenitors with osteogenic and adipogenic potential and their differentiation to the osteogenic lineage. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(4):811-21.
140. Clement-Lacroix P, Ai M, Morvan F, Roman-Roman S, Vayssiere B, Belleville C, et al. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(48):17406-11.
141. Cohen O, Rais T, Lepkifker E, Vered I. Lithium carbonate therapy is not a risk factor for osteoporosis. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1998;30(9):594-7.
142. Zamani A, Omrani GR, Nasab MM. Lithium's effect on bone mineral density. *Bone*. 2009;44(2):331-4.
143. Satija NK, Sharma D, Afrin F, Tripathi RP, Gangenahalli G. High throughput transcriptome profiling of lithium stimulated human mesenchymal stem cells reveals priming towards osteoblastic lineage. *PloS one*. 2013;8(1):e55769.
144. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Reduced relative risk of fractures among users of lithium. *Calcified tissue international*. 2005;77(1):1-8.
145. Bolton JM, Metge C, Lix L, Prior H, Sareen J, Leslie WD. Fracture risk from psychotropic medications: a population-based analysis. *Journal of clinical psychopharmacology*. 2008;28(4):384-91.
146. Wilting I, de Vries F, Thio BM, Cooper C, Heerdink ER, Leufkens HG, et al. Lithium use and the risk of fractures. *Bone*. 2007;40(5):1252-8.
147. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
148. Armitage GC. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 1995;7(1):39-53.
149. Papapanou PN. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol*. 1999;1(4):110-6.
150. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2004;34(1):9-21.

151. Engebretson SP, Lalla E, Lamster IB. Periodontitis and systemic disease. The New York state dental journal. 1999;65(8):30-2.
152. Caton JG, Polson AM. The interdental bleeding index: a simplified procedure for monitoring gingival health. Compend Contin Educ Dent. 1985;6(2):88, 90-2.
153. Armitage GC. Diagnosis of periodontal diseases. Journal of periodontology. 2003;74(8):1237-47.
154. Armitage GC. The complete periodontal examination. Periodontol 2000. 2004;34:22-33.
155. Hamp SE, Nyman S, Lindhe J. Periodontal treatment of multirooted teeth. Results after 5 years. Journal of clinical periodontology. 1975;2(3):126-35.
156. Lindhe J, Nyman S. Clinical trials in periodontal therapy. Journal of Periodontal Research. 1987;22(3):217-21.
157. Jeffcoat MK, Lewis CE, Reddy MS, Wang C-Y, Redford M. Post-menopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. Periodontology 2000. 2000;23(1):94-102.
158. Southard KA, Southard TE, Schlechte JA, Meis PA. The relationship between the density of the alveolar processes and that of post-cranial bone. Journal of dental research. 2000;79(4):964-9.
159. Streckfus CF, Johnson RB, Nick T, Tsao A, Tucci M. Comparison of alveolar bone loss, alveolar bone density and second metacarpal bone density, salivary and gingival crevicular fluid interleukin-6 concentrations in healthy premenopausal and postmenopausal women on estrogen therapy. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1997;52(6):M343-51.
160. Jacobs R, Ghyselen J, Koninckx P, van Steenberghe D. Long-term bone mass evaluation of mandible and lumbar spine in a group of women receiving hormone replacement therapy. Eur J Oral Sci. 1996;104(1):10-6.
161. von Wowern N, Klausen B, Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. Journal of periodontology. 1994;65(12):1134-8.
162. Kribbs PJ, Chesnut Iii CH, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in a population of normal women. The Journal of Prosthetic Dentistry. 1990;63(1):86-9.
163. Kribbs PJ, Chesnut CH, 3rd, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. J Prosthet Dent. 1989;62(6):703-7.
164. Kribbs PJ, Smith DE, Chesnut CH, 3rd. Oral findings in osteoporosis. Part II: Relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalized skeletal osteopenia. J Prosthet Dent. 1983;50(5):719-24.
165. Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. J Prosthet Dent. 1990;63(2):218-22.
166. Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil KD. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. Osteoporos Int. 1999;10(1):34-40.
167. Hirai T, Ishijima T, Hashikawa Y, Yajima T. Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. J Prosthet Dent. 1993;69(1):49-56.
168. Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Dunning DG, Patil KD. The association of cigarette smoking with alveolar bone loss in postmenopausal females. Journal of clinical periodontology. 2000;27(9):658-64.

169. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *Journal of periodontology*. 2000;71(9):1492-8.
170. Groen JJ, Menczel J, Shapiro S. Chronic destructive periodontal disease in patients with presenile osteoporosis. *Journal of periodontology*. 1968;39(1):19-23.
171. Mohammad AR, Brunsvold M, Bauer R. The strength of association between systemic postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *Int J Prosthodont*. 1996;9(5):479-83.
172. Mohammad AR, Bauer RL, Yeh CK. Spinal bone density and tooth loss in a cohort of postmenopausal women. *Int J Prosthodont*. 1997;10(4):381-5.
173. Reinhardt RA, Payne JB, Maze CA, Patil KD, Gallagher SJ, Mattson JS. Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *Journal of periodontology*. 1999;70(8):823-8.
174. Daniell HW. Postmenopausal tooth loss. Contributions to edentulism by osteoporosis and cigarette smoking. *Arch Intern Med*. 1983;143(9):1678-82.
175. Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y, Otani K, Wada T. Oral signs as indicators of possible osteoporosis in elderly women. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;80(5):612-6.
176. Astrom J, Backstrom C, Thidevall G. Tooth loss and hip fractures in the elderly. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72(2):324-5.
177. Krall EA, Dawson-Hughes B, Papas A, Garcia RI. Tooth loss and skeletal bone density in healthy postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 1994;4(2):104-9.
178. Krall EA, Garcia RI, Dawson-Hughes B. Increased risk of tooth loss is related to bone loss at the whole body, hip, and spine. *Calcified tissue international*. 1996;59(6):433-7.
179. Bando K, Nitta H, Matsubara M, Ishikawa I. Bone mineral density in periodontally healthy and edentulous postmenopausal women. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):322-6.
180. Taguchi A, Suei Y, Ohtsuka M, Otani K, Tanimoto K, Hollender LG. Relationship between bone mineral density and tooth loss in elderly Japanese women. *Dentomaxillofac Radiol*. 1999;28(4):219-23.
181. Xie Q, Ainamo A. Association of edentulousness with systemic factors in elderly people living at home. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1999;27(3):202-9.
182. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2002;29:177-206.
183. Timmerman MF, van der Weijden GA. Risk factors for periodontitis. *International Journal of Dental Hygiene*. 2006;4(1):2-7.
184. Lopez R, Fernandez O, Jara G, Baelum V. Epidemiology of clinical attachment loss in adolescents. *Journal of periodontology*. 2001;72(12):1666-74.
185. Aass AM, Tollefsen T, Gjermo P. A cohort study of radiographic alveolar bone loss during adolescence. *Journal of clinical periodontology*. 1994;21(2):133-8.
186. Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Clinical features of early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc*. 1997;128(10):1393-9.
187. Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol 2000*. 2002;29:207-22.

188. Loe H, Brown LJ. Early onset periodontitis in the United States of America. *Journal of periodontology*. 1991;62(10):608-16.
189. Hart TC. Genetic risk factors for early-onset periodontitis. *Journal of periodontology*. 1996;67:355-66.
190. Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *Journal of periodontology*. 1994;65(6):623-30.
191. Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997;14:202-15.
192. Kinane DF, Hart TC. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 2003;14(6):430-49.
193. Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *International journal of dentistry*. 2010;2010:324719.
194. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM. Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *Journal of periodontology*. 2000;71(12):1874-81.
195. Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of periodontology*. 2000;71(5):743-51.
196. Bergstrom J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *Journal of periodontology*. 2000;71(8):1338-47.
197. Chesnut CH, 3rd. The relationship between skeletal and oral bone mineral density: an overview. *Ann Periodontol*. 2001;6(1):193-6.
198. Payne JB, Zachs NR, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil K. The association between estrogen status and alveolar bone density changes in postmenopausal women with a history of periodontitis. *Journal of periodontology*. 1997;68(1):24-31.
199. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho AW, Trevisan M, Genco RJ. Calcium and the risk for periodontal disease. *Journal of periodontology*. 2000;71(7):1057-66.
200. Hildebolt CF. Effect of vitamin D and calcium on periodontitis. *Journal of periodontology*. 2005;76(9):1576-87.
201. Ortega RM, Requejo AM, Encinas Sotillos A, Andres P, Lopez-Sobaler AM, Quintas E. [Implication of calcium deficiency in the progress of periodontal diseases and osteoporosis]. *Nutr Hosp*. 1998;13(6):316-9.
202. Haytac MC, Antmen B, Dogan MC, Sasmaz I. Severe alveolar bone loss and gingival hyperplasia as initial manifestation of Burkitt cell type acute lymphoblastic leukemia. *Journal of periodontology*. 2003;74(4):547-51.
203. Ashok L, Sujatha GP, Hema G. Estimation of salivary amylase and total proteins in leukemia patients and its correlation with clinical feature and radiographic finding. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2010;21(4):486-90.
204. Chung SW, Kim S, Choi JR, Yoo TH, Cha IH. Osteolytic mandible presenting as an initial manifestation of an adult acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40(12):1438-40.

205. Luppapornlarp S, Leelataweewud P, Putongkam P, Ketanont S. Periodontal status and orthodontic treatment need of autistic children. *World J Orthod.* 2010;11(3):256-61.
206. Vajawat M, Deepika PC. Comparative evaluation of oral hygiene practices and oral health status in autistic and normal individuals. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2012;2(2):58-63.
207. Jaber MA. Dental caries experience, oral health status and treatment needs of dental patients with autism. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(3):212-7.
208. Marotte H, Farge P, Gaudin P, Alexandre C, Mouglin B, Miossec P. The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. *Annals of the rheumatic diseases.* 2006;65(7):905-9.
209. Al-Katma MK, Bissada NF, Bordeaux JM, Sue J, Askari AD. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2007;13(3):134-7.
210. Krall EA. The periodontal-systemic connection: implications for treatment of patients with osteoporosis and periodontal disease. *Ann Periodontol.* 2001;6(1):209-13.
211. Taut AD, Jin Q, Chung JH, Galindo-Moreno P, Yi ES, Sugai JV, et al. Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2013;28(11):2347-56.
212. Jing Y, 1, JF, 1, HZ, 1, et al. Role of DKK1 in Periodontitis and Innovative Strategy with its Neutralizing Antibody for Periodontitis Treatment. *OHDM.* 2014;13.
213. Rocha ML, Malacara JM, Sanchez-Marin FJ, Vazquez de la Torre CJ, Fajardo ME. Effect of alendronate on periodontal disease in postmenopausal women: a randomized placebo-controlled trial. *Journal of periodontology.* 2004;75(12):1579-85.
214. Yaffe A, Iztzovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *Journal of periodontology.* 1997;68(9):884-9.
215. Reddy MS, Weatherford TW, 3rd, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *Journal of periodontology.* 1995;66(3):211-7.
216. Norderyd OM, Grossi SG, Machtei EE, Zambon JJ, Hausmann E, Dunford RG, et al. Periodontal status of women taking postmenopausal estrogen supplementation. *Journal of periodontology.* 1993;64(10):957-62.
217. Paganini-Hill A. The benefits of estrogen replacement therapy on oral health. The Leisure World cohort. *Arch Intern Med.* 1995;155(21):2325-9.
218. Krall EA, Dawson-Hughes B, Hannan MT, Wilson PW, Kiel DP. Postmenopausal estrogen replacement and tooth retention. *Am J Med.* 1997;102(6):536-42.
219. Grodstein F, Colditz GA, Stampfer MJ. Post-menopausal hormone use and tooth loss: a prospective study. *J Am Dent Assoc.* 1996;127(3):370-7, quiz 92.
220. Miley DD, Garcia MN, Hildebolt CF, Shannon WD, Couture RA, Anderson Spearie CL, et al. Cross-sectional study of vitamin D and calcium supplementation effects on chronic periodontitis. *Journal of periodontology.* 2009;80(9):1433-9.

221. Krall EA, Wehler C, Garcia RI, Harris SS, Dawson-Hughes B. Calcium and vitamin D supplements reduce tooth loss in the elderly. *Am J Med.* 2001;111(6):452-6.
222. Karasneh JA, Ababneh KT, Taha AH, Al-Abbadi MS, Marzouka N, Jaradat SM, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with chronic and aggressive periodontitis in Jordanian patients. *Eur J Oral Sci.* 2013;121(6):551-8.
223. Nosaka Y, Tachi Y, Shimpuku H, Kawamura T, Ohura K. Association of calcitonin receptor gene polymorphism with early marginal bone loss around endosseous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(1):38-43.
224. Zhang L, Meng H, Zhao H, Li Q, Xu L, Chen Z, et al. Estrogen receptor-alpha gene polymorphisms in patients with periodontitis. *J Periodontal Res.* 2004;39(5):362-6.
225. Zhang X, Dai J, Long Y, Wu H, Li XJ, Ding Y. Correlation of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density in Chinese women with chronic periodontitis. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(22):3262-7.
226. Zhang X, Long Y, Li HY, Li XJ, Ding Y. [Estrogen receptors gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2010;28(2):139-44.
227. Breivik T, Thrane PS, Gjermo P, Opstad PK. Glucocorticoid receptor antagonist RU 486 treatment reduces periodontitis in Fischer 344 rats. *J Periodontal Res.* 2000;35(5):285-90.
228. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology.* 1997;24(1):72-7.
229. Diehl SR, Wang Y, Brooks CN, Burmeister JA, Califano JV, Wang S, et al. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of periodontology.* 1999;70(4):418-30.
230. Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontal Res.* 2000;35(2):102-7.
231. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, et al. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *Journal of clinical periodontology.* 2001;28(12):1137-44.
232. Kalburgi NB, Bhatia A, Bilichodmath S, Patil SR, Mangalekar SB, Bhat K. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Indian patients with chronic periodontitis. *J Oral Sci.* 2010;52(3):431-7.
233. Holla LI, Fassmann A, Stejskalova A, Znojil V, Vanek J, Vacha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology.* 2004;75(1):30-6.
234. Yang W, Jia Y, Wu H. Four tumor necrosis factor alpha genes polymorphisms and periodontitis risk in a Chinese population. *Hum Immunol.* 2013;74(12):1684-7.
235. Gao H, Tian Y, Meng H, Hou J, Xu L, Zhang L, et al. Associations of apolipoprotein E and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms with dyslipidemia and generalized aggressive periodontitis in a Chinese population. *Journal of Periodontal Research.* 2014:n/a-n/a.
236. Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, Demasi AP, et al. Involvement of the Wnt-beta-catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2014;41(6):550-7.

237. Lanctot C, Lamolet B, Drouin J. The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development (Cambridge, England)*. 1997;124(14):2807-17.
238. Mitsiadis TA, Drouin J. Deletion of the Pitx1 genomic locus affects mandibular tooth morphogenesis and expression of the Barx1 and Tbx1 genes. *Developmental Biology*. 2008;313(2):887-96.
239. Gage PJ, Suh H, Camper SA. The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mamm Genome*. 1999;10(2):197-200.
240. Drouin J, Lamolet B, Lamonerie T, Lanctôt C, Tremblay JJ. The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1998;140(1-2):31-6.
241. Lopez S, Island ML, Drouin J, Bandu MT, Christeff N, Darracq N, et al. Repression of virus-induced interferon A promoters by homeodomain transcription factor Ptx1. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(20):7527-40.
242. Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7706-10.
243. Szeto DP, Rodriguez-Esteban C, Ryan AK, O'Connell SM, Liu F, Kioussi C, et al. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev*. 1999;13(4):484-94.
244. Lanctot C, Moreau A, Chamberland M, Tremblay ML, Drouin J. Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development*. 1999;126(9):1805-10.
245. Marcil A, Dumontier E, Chamberland M, Camper SA, Drouin J. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development*. 2003;130(1):45-55.
246. Mitsiadis TA, Drouin J. Deletion of the Pitx1 genomic locus affects mandibular tooth morphogenesis and expression of the Barx1 and Tbx1 genes. *Dev Biol*. 2008;313(2):887-96.
247. Picard C, Azeddine B, Moldovan F, Martel-Pelletier J, Moreau A. New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;462:59-66.
248. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev*. 1996;10(10):1284-95.
249. Quirk CC, Lozada KL, Keri RA, Nilson JH. A single Pitx1 binding site is essential for activity of the LHbeta promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol*. 2001;15(5):734-46.
250. Baird-Titus JM, Clark-Baldwin K, Dave V, Caperelli CA, Ma J, Rance M. The solution structure of the native K50 Bicoid homeodomain bound to the consensus TAATCC DNA-binding site. *J Mol Biol*. 2006;356(5):1137-51.
251. Fortin J, Bernard DJ. SMAD3 and EGR1 physically and functionally interact in promoter-specific fashion. *Cell Signal*. 2010;22(6):936-43.
252. Lamba P, Khivansara V, D'Alessio AC, Santos MM, Bernard DJ. Paired-like homeodomain transcription factors 1 and 2 regulate follicle-stimulating hormone beta-subunit transcription through a conserved cis-element. *Endocrinology*. 2008;149(6):3095-108.

253. Coss D, Thackray VG, Deng CX, Mellon PL. Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through Smad-binding and homeobox elements. *Mol Endocrinol.* 2005;19(10):2610-23.
254. Island ML, Mesplede T, Darracq N, Bandu MT, Christeff N, Djian P, et al. Repression by homeoprotein pitx1 of virus-induced interferon α promoters is mediated by physical interaction and trans repression of IRF3 and IRF7. *Mol Cell Biol.* 2002;22(20):7120-33.
255. Jeong KH, Chin WW, Kaiser UB. Essential role of the homeodomain for pituitary homeobox 1 activation of mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression through interactions with c-Jun and DNA. *Mol Cell Biol.* 2004;24(14):6127-39.
256. Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y, Drouin J. Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J.* 1999;18(12):3431-41.
257. Jeyabalan J, Nesbit MA, Galvanovskis J, Callaghan R, Rorsman P, Thakker RV. SEDLIN forms homodimers: characterisation of SEDLIN mutations and their interactions with transcription factors MBP1, PITX1 and SF1. *PLoS One.* 2010;5(5):e10646.
258. Tremblay JJ, Drouin J. Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone beta gene transcription. *Mol Cell Biol.* 1999;19(4):2567-76.
259. Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, et al. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell.* 2005;121(6):849-58.
260. Liu DX, Lobie PE. Transcriptional activation of p53 by Pitx1. *Cell Death Differ.* 2007;14(11):1893-907.
261. Pandey SN, Cabotage J, Shi R, Dixit M, Sutherland M, Liu J, et al. Conditional over-expression of PITX1 causes skeletal muscle dystrophy in mice. *Biology open.* 2012;1(7):629-39.
262. Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K. The c-Abl tyrosine kinase stabilizes Pitx1 in the apoptotic response to DNA damage. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death.* 2010;15(8):927-35.
263. Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, et al. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5. *Molecular and cellular biology.* 2011;31(8):1624-36.
264. Chen Y, Knosel T, Ye F, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Petersen I. Decreased PITX1 homeobox gene expression in human lung cancer. *Lung Cancer.* 2007;55(3):287-94.
265. Chen YN, Chen H, Xu Y, Zhang X, Luo Y. Expression of pituitary homeobox 1 gene in human gastric carcinogenesis and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol.* 2008;14(2):292-7.
266. Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, et al. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell.* 2002;1(2):203-9.
267. Chen Y, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Ye F, Petersen I. 5-Bromodeoxyuridine induced differentiation of a human small cell lung cancer cell line is

associated with alteration of gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;353(3):559-64.

268. Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, et al. Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *Surgery*. 2005;138(5):924-31.

269. Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camano P, Dauwerse JG, et al. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science (New York, NY)*. 2010;329(5999):1650-3.

270. Dixit M, Ansseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, et al. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(46):18157-62.

271. Vanderplanck C, Ansseau E, Charron S, Stricwant N, Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, et al. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26820.

272. Gurnett CA, Alaei F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, et al. Asymmetric lower-limb malformations in individuals with homeobox PITX1 gene mutation. *American journal of human genetics*. 2008;83(5):616-22.

273. Alvarado DM, Aferol H, McCall K, Huang JB, Techy M, Buchan J, et al. Familial isolated clubfoot is associated with recurrent chromosome 17q23.1q23.2 microduplications containing TBX4. *American journal of human genetics*. 2010;87(1):154-60.

274. Alvarado DM, McCall K, Aferol H, Silva MJ, Garbow JR, Spees WM, et al. Pitx1 haploinsufficiency causes clubfoot in humans and a clubfoot-like phenotype in mice. *Human molecular genetics*. 2011;20(20):3943-52.

275. Klopocki E, Kahler C, Foulds N, Shah H, Joseph B, Vogel H, et al. Deletions in PITX1 cause a spectrum of lower-limb malformations including mirror-image polydactyly. *European journal of human genetics : EJHG*. 2012;20(6):705-8.

276. Zhang R, Yang G, Wu X, Xie J, Yang X, Li T. Disruption of Wnt/beta-catenin signaling in odontoblasts and cementoblasts arrests tooth root development in postnatal mouse teeth. *International journal of biological sciences*. 2013;9(3):228-36.

277. Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, et al. Wnt/ β -catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology*. 2008;313(1):210-24.

278. Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell*. 2002;2(5):643-53.

279. van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & development*. 1994;8(22):2691-703.

280. Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mechanisms of Development*. 1999;85(1-2):197-200.

281. Jarvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, Thesleff I. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(49):18627-32.

282. Lim WH, Liu B, Cheng D, Williams BO, Mah SJ, Helms JA. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Journal of periodontal research*. 2014.
283. Ren Y, Han X, Ho SP, Harris SE, Cao Z, Economides AN, et al. Removal of SOST or blocking its product sclerostin rescues defects in the periodontitis mouse model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015.
284. Kuchler U, Schwarze UY, Dobsak T, Heimel P, Bosshardt DD, Kneissel M, et al. Dental and periodontal phenotype in sclerostin knockout mice. *International journal of oral science*. 2014;6(2):70-6.
285. Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R. FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1*(-/-) mice. *Genes & development*. 2002;16(24):3173-85.
286. Sasaki T, Ito Y, Xu X, Han J, Bringas P, Jr., Maeda T, et al. LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. *Developmental biology*. 2005;278(1):130-43.
287. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1202-9.
288. Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, et al. Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell*. 2002;111(5):673-85.
289. Basu M, Roy SS. Wnt/beta-catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(6):4355-67.
290. Abu-Elmagd M, Robson L, Sweetman D, Hadley J, Francis-West P, Munsterberg A. Wnt/Lef1 signaling acts via Pitx2 to regulate somite myogenesis. *Dev Biol*. 2010;337(2):211-9.
291. Kalajzic I, Kalajzic Z, Kaliterna M, Gronowicz G, Clark SH, Lichtler AC, et al. Use of type I collagen green fluorescent protein transgenes to identify subpopulations of cells at different stages of the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res*. 2002;17(1):15-25.
292. Foundation NO. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. 2010.
293. Scane AC, Sutcliffe AM, Francis RM. Osteoporosis in men. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1993;7(3):589-601.
294. Mirza FS, Padhi ID, Raisz LG, Lorenzo JA. Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(4):1991-7.
295. Modder UI, Roforth MM, Hoey K, McCready LK, Peterson JM, Monroe DG, et al. Effects of estrogen on osteoprogenitor cells and cytokines/bone-regulatory factors in postmenopausal women. *Bone*. 2011;49(2):202-7.
296. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*. 2010;464(7288):520-8.
297. Anachelin M, Alcaraz-Perez F, Martinez CM, Bernabe-Garcia M, Mulero V, Cayuela ML. Premature aging in telomerase-deficient zebrafish. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(5):1101-12.
298. Strong MA, Vidal-Cardenas SL, Karim B, Yu H, Guo N, Greider CW. Phenotypes in mTERT(+)/(-) and mTERT(-)/(-) mice are due to short telomeres, not

- telomere-independent functions of telomerase reverse transcriptase. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(12):2369-79.
299. Hao LY, Armanios M, Strong MA, Karim B, Feldser DM, Huso D, et al. Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity. *Cell*. 2005;123(6):1121-31.
 300. Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(44):15960-4.
 301. Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(7):2205-10.
 302. Beck TJ, Ruff CB, Warden KE, Scott WW, Jr., Rao GU. Predicting femoral neck strength from bone mineral data. A structural approach. *Invest Radiol*. 1990;25(1):6-18.
 303. Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayaka AR, et al. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(7):1425-36.
 304. Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, et al. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(4):2498-502.
 305. Dequeker J. Inverse relationship of interface between osteoporosis and osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1997;24(4):795-8.
 306. Lodewyckx L, Lories RJ. WNT Signaling in osteoarthritis and osteoporosis: what is the biological significance for the clinician? *Current rheumatology reports*. 2009;11(1):23-30.
 307. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, et al. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*. 2004;18(9):1072-87.
 308. Flores I, Benetti R, Blasco MA. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current opinion in cell biology*. 2006;18(3):254-60.
 309. De Langhe SP, Carraro G, Tefft D, Li C, Xu X, Chai Y, et al. Formation and Differentiation of Multiple Mesenchymal Lineages during Lung Development Is Regulated by β -catenin Signaling. *PLoS ONE*. 2008;3(1):e1516.
 310. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*. 2005;8(5):739-50.
 311. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*. 2005;8(5):739-50.
 312. Bain G, Muller T, Wang X, Papkoff J. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;301(1):84-91.

313. Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens, Greece)*. 2007;6(4):279-94.
314. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, et al. Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation*. 2007;75(5):452-62.
315. Zhang H, Wang J, Deng F, Huang E, Yan Z, Wang Z, et al. Canonical Wnt signaling acts synergistically on BMP9-induced osteo/odontoblastic differentiation of stem cells of dental apical papilla (SCAPs). *Biomaterials*. 2015;39(0):145-54.
316. Choi J, Southworth LK, Sarin KY, Venteicher AS, Ma W, Chang W, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS genetics*. 2008;4(1):e10.
317. Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. 2009;460(7251):66-72.
318. Li C, Wei G, Gu Q, Wang Q, Tao S, Xu L. Proliferation and differentiation of rat osteoporosis mesenchymal stem cells (MSCs) after telomerase reverse transcriptase (TERT) transfection. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2015;21:845-54.
319. SAEED, #160, Hamid, ABDALLAH, #160, M. B, et al. Telomerase-Deficient Mice Exhibit Bone Loss Owing to Defects in Osteoblasts and Increased Osteoclastogenesis by Inflammatory Microenvironment. Hoboken, NJ, ETATS-UNIS: Wiley; 2011. 12 p.
320. Kamata N, Fujimoto R, Tomonari M, Taki M, Nagayama M, Yasumoto S. Immortalization of human dental papilla, dental pulp, periodontal ligament cells and gingival fibroblasts by telomerase reverse transcriptase. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2004;33(7):417-23.
321. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(10):1842-53.
322. Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development (Cambridge, England)*. 2004;131(6):1309-18.
323. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*. 2005;8(5):727-38.
324. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(19):14515-24.
325. Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Hoffmann JM, Svensson PA, Grimsby J, et al. BMP4 and BMP antagonists regulate human white and beige adipogenesis. *Diabetes*. 2015.

326. Gustafson B, Smith U. The WNT inhibitor Dickkopf 1 and bone morphogenetic protein 4 rescue adipogenesis in hypertrophic obesity in humans. *Diabetes*. 2012;61(5):1217-24.
327. St Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, et al. Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol*. 2000;217(2):323-32.
328. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy*. 2007;9 Suppl 1:S1.
329. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcified tissue international*. 1981;33(4):349-51.
330. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature medicine*. 2011;17(10):1231-4.
331. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature medicine*. 2011;17(10):1235-41.
332. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*. 2005;8(5):751-64.
333. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, et al. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(22):21162-8.
334. Sato MM, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M. Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/beta-catenin signaling-induced osteoprotegerin expression. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2009;14(2):141-53.
335. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 7):1283-96.
336. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One*. 2011;6(10):e25900.
337. Sclerostin regulates RANKL expression in osteocytes. *BoneKEy Rep*. 2012;1.
338. Qiang YW, Chen Y, Stephens O, Brown N, Chen B, Epstein J, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood*. 2008;112(1):196-207.
339. Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, et al. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS One*. 2007;2(10):e1058.
340. Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, Deng L, Karsenty G, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell*. 2006;10(6):771-82.
341. Saita Y, Takagi T, Kitahara K, Usui M, Miyazono K, Ezura Y, et al. Lack of Schnurri-2 expression associates with reduced bone remodeling and osteopenia. *J Biol Chem*. 2007;282(17):12907-15.

342. Kim HJ, Minashima T, McCarthy EF, Winkles JA, Kirsch T. Progressive ankylosis protein (ANK) in osteoblasts and osteoclasts controls bone formation and bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 2010;25(8):1771-83.
343. Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a *Prxl* enhancer. *Genesis (New York, NY : 2000).* 2002;33(2):77-80.
344. Wang Y, Cox MK, Coricor G, MacDougall M, Serra R. Inactivation of *Tgfb2* in Osterix-Cre expressing dental mesenchyme disrupts molar root formation. *Developmental biology.* 2013;382(1):27-37.
345. Bargman R, Huang A, Boskey AL, Raggio C, Pleshko N. RANKL inhibition improves bone properties in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Connective tissue research.* 2010;51(2):123-31.
346. Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, Tsumaki N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2006;21(7):1022-33.
347. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(12):970-82.
348. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700.
349. Philippi A, Tores F, Carayol J, Rousseau F, Letexier M, Roschmann E, et al. Association of autism with polymorphisms in the paired-like homeodomain transcription factor 1 (*PITX1*) on chromosome 5q31: a candidate gene analysis. *BMC Med Genet.* 2007;8:74.
350. Chamberlain RS, Herman BH. A novel biochemical model linking dysfunctions in brain melatonin, proopiomelanocortin peptides, and serotonin in autism. *Biol Psychiatry.* 1990;28(9):773-93.
351. Curin JM, Terzic J, Petkovic ZB, Zekan L, Terzic IM, Susnjara IM. Lower cortisol and higher ACTH levels in individuals with autism. *J Autism Dev Disord.* 2003;33(4):443-8.
352. Nagel S, Venturini L, Przybylski GK, Grabarczyk P, Schneider B, Meyer C, et al. Activation of Paired-homeobox gene *PITX1* by del(5)(q31) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(7):1348-59.
353. Heo JS, Lee SY, Lee JC. Wnt/beta-catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts. *Molecules and cells.* 2010;30(5):449-54.
354. Roy C. Page HES. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. 1982.
355. Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infection and immunity.* 2000;68(10):5864-8.
356. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral microbiology and immunology.* 2006;21(1):12-20.

357. Sharma A, Inagaki S, Honma K, Sfintescu C, Baker PJ, Evans RT. Tannerella forsythia-induced alveolar bone loss in mice involves leucine-rich-repeat BspA protein. *Journal of dental research*. 2005;84(5):462-7.
358. Hajishengallis G, Shakhatreh MA, Wang M, Liang S. Complement receptor 3 blockade promotes IL-12-mediated clearance of *Porphyromonas gingivalis* and negates its virulence in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179(4):2359-67.
359. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *Journal of periodontology*. 2007;78(6):1120-8.